

**Einfluss veränderter CYP2B1-Aktivität und -mRNA-Expression nach
Induktion in vivo auf die nachfolgende Induzierbarkeit in vitro an
Rattenleberschnitten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Christian Lerch
geboren am 25.07.1976 in Hildesheim.

Gutachter 1: PD Dr. med. Reinhild Glöckner, Jena

Gutachter 2: PD Dr. rer. nat. Marion Hippus, Jena

Gutachter 3: PD Dr. med. Michael Kretzschmar, Altenburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.05.2008

Abkürzungsverzeichnis

BNF	Beta-Naphthoflavon
bp	Basenpaare
BROD	7-Benzoyloxyresorufin-O-Debenzylierung
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CYP	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
i.p.	intraperitoneal
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KO-Maus	„knocked out“-Maus
LDH	Laktat-Dehydrogenase
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
p.o.	per os
PB	Phenobarbital
PCN	Pregnenolon-16 α -Carbonitril
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PROD	7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR (reverse transcriptase-PCR)
U/min	Umdrehungen pro Minute
WME	Williams Medium E

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 ZUSAMMENFASSUNG	6
2 EINLEITUNG	8
2.1 Biotransformation	8
2.2 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)	10
2.3 Induktion von CYP	11
2.3.1 Induktion von CYP2B	14
2.3.2 CYP2B-Modellinduktor Phenobarbital (PB)	15
2.4 Modelle zur Untersuchung der CYP-Induktion	16
2.4.1 In-vivo-Modelle	16
2.4.2 In-vitro-Modelle	16
2.5 CYP2B-Induktion in Präzisionsleberschnitten	20
3 ZIELE DER ARBEIT	23
4 MATERIAL UND METHODEN	25
4.1 Gewinnen und Behandeln von Gewebematerial aus Versuchstieren	25
4.1.1 Versuchstiere	25
4.1.2 Vorbehandlung der Versuchstiere	25
4.1.3 Herstellen der Leberschnitte	25
4.1.4 Inkubation der Leberschnitte	27
4.1.5 Herstellung von Homogenat aus Leberschnitten	28
4.2 Bestimmung der CYP2B-Induktion an Rattenleberschnitten	29
4.2.1 Bestimmung der PROD-Aktivität an Leberschnittthomogenat	29
4.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes als Bezugsgröße für die PROD	30
4.2.3 Bestimmung der CYP2B1-mRNA-Expression	31
4.3 Statistik	37

5	ERGEBNISSE	38
5.1	CYP2B-Induktion in vitro in Leberschnitten unbehandelter Ratten	38
5.1.1	PROD-Aktivität	38
5.1.2	CYP2B1-mRNA-Expression	39
5.2	CYP2B-Induktion in vitro in Leberschnitten vorbehandelter Ratten	40
5.2.1	Leberentnahme 24h nach der letzten PB-Applikation in vivo	40
5.2.2	Leberentnahme 48h nach der letzten PB-Applikation in vivo	42
5.2.3	Leberentnahme 72h nach der letzten PB-Applikation in vivo	44
5.2.4	Leberentnahme 4 Tage und länger nach der letzten PB-Applikation in vivo	45
5.3	Vergleich der Versuchsserien	46
5.3.1	Vergleich der PROD-Aktivitäten	46
5.3.2	Vergleich der CYP2B1-mRNA-Konzentrationen	49
6	DISKUSSION	51
6.1	Einfluss von PB in vivo auf die CYP2B-Expression in den Leberschnitten	51
6.2	Abklingen der in vivo ausgelösten CYP2B-Induktion in den Leberschnitten während der Inkubation	55
6.3	CYP2B-Induzierbarkeit in vitro in Leberschnitten PB-behandelter Ratten	57
6.4	Ausblick auf die Nutzung von Präzisionsleberschnitten	60
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	62
8	LITERATURVERZEICHNIS	63
	ANHANG	74
	Abbildungsverzeichnis	74
	Tabellenverzeichnis	76
	Danksagung	77
	Lebenslauf	78
	Ehrenwörtliche Erklärung	79

1 Zusammenfassung

Präzisionsleberschnitte von Ratten haben sich als geeignetes In-vitro-Modell zur Untersuchung der Cytochrom-P450 (CYP) -Induktion erwiesen. Dabei wurde bisher überwiegend Gewebe unbehandelter Tiere verwendet. Zur Umgehung der Speziesunterschiede zwischen Tier und Mensch und zur Reduktion der Anzahl von Tierversuchen ist die Verwendung von humanem Gewebe erstrebenswert. Bei unbekanntem CYP-Expressionsmuster inklusive der möglichen Einflüsse von Krankheitsprozessen und Medikamenten und einer damit verbundenen starken interindividuellen Streuung ist die Bewertung von Ergebnissen, die mit Humanmaterial gewonnen werden können, jedoch problematisch. Deshalb sollte zunächst am standardisierten Tiermodell „Präzisionsleberschnitt“ überprüft werden, ob der Expressionszustand des Spendergewebes den Nachweis der CYP-Induzierbarkeit in vitro beeinträchtigt oder nicht.

Hierzu wurde der Frage nachgegangen, wie stark und wie lang sich eine Phenobarbital (PB) -Behandlung in vivo auf die Expression von CYP2B in Leberschnitten (in vitro) auswirkt. Des Weiteren wurde untersucht, ob in Abhängigkeit vom Ausgangsniveau der CYP2B-Expression eine erneute Induktion durch PB-Behandlung in vitro möglich ist.

Die Versuchstiere - ca. 40 Tage alte, männliche Han:Wist-Ratten - erfuhren eine 3-malige PB-Applikation (60 mg/kg KG i.p.) im Abstand von 24 Stunden. Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten 24, 48 oder 72 Stunden nach der letzten PB-Gabe, in einigen Versuchen noch später. Anschließend wurden die Schnitte bis zu 24 Stunden ohne oder mit PB (10^{-4} M) im Kulturmedium inkubiert. Die CYP2B-Induktion wurde auf Ebene der Enzymaktivität mittels Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD) und stichprobenartig anhand der CYP2B1-mRNA-Konzentration quantifiziert.

In Leberschnitten unbehandelter Ratten waren die CYP2B-katalysierte PROD und die basale CYP2B1-mRNA-Expression sehr niedrig und wurden erwartungsgemäß durch PB in vitro deutlich induziert. In Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten war die PROD zunächst 20-fach stärker ausgeprägt als in Leberschnitten unbehandelter Tiere. Mit zunehmendem Abstand zur letzten Vorbehandlung verringerte sich dieser In-vivo-Induktionseffekt nur allmählich, so dass die PROD 6 Tage nach der letzten PB-Applikation noch immer ca. 2,5-fach erhöht war. In vitro war unabhängig vom Initialwert ein Aktivitätsabfall der PROD um ca. 50% innerhalb von 24 Stunden Schnittinkubation zu

verzeichnen, wodurch der Unterschied zwischen Leberschnitten von unbehandelten und vorbehandelten Tieren erhalten blieb. Eine erneute Induktion der PROD durch PB-Exposition in vitro war bei noch hohen Ausgangswerten zum Zeitpunkt der Schnittpräparation nicht oder nur eingeschränkt auslösbar. Auch die CYP2B1-mRNA-Konzentration der Leberschnitte war durch In-vivo-Vorbehandlung stark erhöht. Der Abfall verlief aber in vivo und in vitro vergleichsweise rasch, sodass sowohl 48 Stunden nach der letzten PB-Gabe als auch nach 24-stündiger Schnittinkubation keine nennenswerten Unterschiede mehr beobachtet wurden. Eine erneute CYP2B1-mRNA-Induktion durch PB-Exposition in vitro war in jedem Fall möglich.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die CYP2B-Induktion mittels PB in vitro in Rattenleberschnitten PB-vorbehandelter Tiere nur auf mRNA-Ebene uneingeschränkt nachweisbar ist, auf Enzymaktivitätsebene aber durch hohe Ausgangslage maskiert sein kann, wenn das Spendergewebe bereits in vivo induziert wurde.

2 Einleitung

Die ständige Entwicklung neuer Substanzen macht eine Vielzahl von Tierversuchen erforderlich, um für den Organismus potentiell schädliche Einflüsse sowie Wechselwirkungen mit anderen Substanzen zu erkennen. Tierversuche sind jedoch ethisch bedenklich und können oft nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Eine Alternative stellt die Entwicklung von In-vitro-Modellen dar. Hierzu gehören beispielsweise auch Präzisionsleberschnitte, welche sich besonders zur Untersuchung von Biotransformationsprozessen eignen (Parkinson 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion des Enzyms CYP2B an Präzisionsleberschnitten untersucht, welche einen speziellen Aspekt bei der Biotransformation darstellt. Im Folgenden werden zunächst die Grundbegriffe erläutert.

2.1 Biotransformation

Täglich werden vom menschlichen Organismus - neben den für Aufbau und Energiegewinnung benötigten Nährstoffen - unzählige, nicht verwertbare chemische Verbindungen (Xenobiotika) aufgenommen. Dazu gehören Substanzen aus dem Sekundärstoffwechsel von Pflanzen und Tieren, Lebensmittelzusatzstoffe, Umweltgifte, Pflanzenschutzmittel sowie Arznei- und Genussmittel. Die Aufnahme geschieht größtenteils durch gastrointestinale Resorption. Weitere wichtige Wege der Resorption von Fremdstoffen stellen die Lunge (Gase, Partikel, Dämpfe, Aerosole) und die Haut (Kosmetika oder Lösungsmittel) dar (Testa & Krämer 2006). Des Weiteren fallen endogene Stoffwechselprodukte an, die vom Körper nicht verwertet werden können. Zur Vermeidung einer Akkumulation und damit Schädigung des Organismus müssen diese überwiegend lipophilen Substanzen effektiv beseitigt werden. Hierbei spielt die Biotransformation eine wichtige Rolle (Testa & Krämer 2006).

Durch die Biotransformation wird die Löslichkeit lipophiler Substanzen für die zwei Hauptwege ihrer Ausscheidung verbessert. Diese Wege führen über Filtration der Nieren in den Harn und über die Gallenflüssigkeit in die Faezes und funktionieren auf Basis wässriger Transportmedien (Meyer 1996). Das biotransformierende System hat sich im Rahmen der Evolution durch die ständige Wechselwirkung von Organismen mit ihrer

Umwelt entwickelt. Bei höheren Lebewesen ist es vor allem in der Leber lokalisiert. Weiterhin finden sich Enzyme für die Biotransformation in Darm, Niere und Lunge (Meyer 1996). Auch in Mikroorganismen und Pflanzen kann man diese Enzymgruppen nachweisen (Fukuda et al. 1993, Alekseeva 2004). Allerdings kann die Biotransformation nicht allgemein als rein protektives System verstanden werden, weil einige Substanzen erst durch die enzymatische Modifizierung toxisch oder karzinogen wirken. Dieser Prozess wird dann als Giftung bezeichnet (Yamazaki et al. 1995, Constan et al. 1999).

Die Möglichkeit der Biotransformation unterliegt zwischen verschiedenen Spezies großen Schwankungen. Dies macht die Übertragbarkeit von aus Tierversuchen gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen problematisch. Weitere Unterschiede in der Ausprägung von Biotransformationsenzymen lassen sich zwischen den Geschlechtern feststellen. Aber auch interindividuell tritt eine enorme Variabilität auf. Beeinflussende Faktoren können genetische Prädispositionen, Alter, Ernährungsgewohnheiten, Umweltfaktoren oder Krankheitszustände sein (Gibson et al. 2002).

Es lassen sich zwei Phasen bei der Biotransformation unterscheiden. In Phase I werden den Ausgangsverbindungen zunächst funktionelle Gruppen (z.B. -OH, -SH) angehängt (Funktionalisierungsphase), welche in Phase II mit polaren, wasserlöslichen Gruppen konjugieren (Glucuronidierung, Sulfatierung, Amidierung). Durch diesen Prozess wird die Löslichkeit der Verbindungen für den Harn oder die Faezes verbessert und damit ihre Ausscheidung gewährleistet. Die wichtigste Enzymfamilie der Phase I bilden die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) (Testa & Krämer 2006). Sie sind Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit und sollen im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

2.2 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)

“We believe it is safe to predict that each mammalian species may be found to have up to a hundred P450 isoforms that respond in toto to a thousand or more inducers and that, along with P450s from other sources, metabolize a million or more potential substrates.”
(Coon et al. 1996)

Die CYP bilden die wichtigste Enzymgruppe bei der Biotransformation. Es handelt sich um Hämoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 45 und 55 kD, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Der Name leitet sich aus der Tatsache ab, dass die prosthetische Gruppe - das Hämin - unter CO-Begasung im reduzierten Zustand (Häm) ein charakteristisches Absorptionsmaximum (P steht hierbei für peak (engl.: Spitze, Maximum)) bei 450 nm aufweist. Ihre Erstbeschreibung geht auf Klingenberg im Jahre 1958 zurück, der sie als CO-bindende Membranpigmente in Lebermikrosomen von Säugetieren beschrieb (Klingenberg 1958). 1991 wurde die Abkürzung CYP empfohlen, welche die Superfamilie kennzeichnet (Nebert et al. 1991). Bei $\geq 40\%$ iger Übereinstimmung der Aminosäuresequenz werden die Enzyme zu einer Familie zusammengefasst und mit einer arabischen Zahl gekennzeichnet. Enzyme mit einer Sequenzübereinstimmung von $\geq 55\%$ bilden eine Subfamilie und werden mit Großbuchstaben von A bis Z eingeteilt. Bei Mäusen werden Kleinbuchstaben für die Unterteilung der Subfamilien verwendet (Nebert et al. 1991). Die Isoenzyme innerhalb dieser Subfamilien werden mit einer weiteren arabischen Zahl voneinander unterschieden. Die CYP benötigen für ihre volle Funktionsfähigkeit verschiedene Co-Faktoren. In erster Linie muss zunächst ein Substratmolekül gebunden werden. Dieser Vorgang versetzt das im Hämin zentral gebundene Fe^{3+} in einen energetisch höheren Zustand und ermöglicht die Bindung von molekularem Sauerstoff (Coon et al. 1996). Mithilfe der NADPH-CYP-Reduktase wird von NADPH ein Elektron auf das Eisen übertragen und dieses zu Fe^{2+} reduziert. Das resultierende Häm kann nun molekularen Sauerstoff als $[\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2]$ -Komplex binden. Im nächsten Schritt erfolgt eine weitere Übertragung eines Elektrons entweder durch lösliches Cytochrom b5, welches seinerseits durch eine Reduktase aktiviert wurde oder wieder durch die NADPH-CYP-Reduktase. Der entstehende hochreaktive $[\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^-]$ -Komplex kann im weiteren Verlauf die Substratoxidation bewirken.

Es wird angenommen, dass dies nach Abspaltung eines Sauerstoffatoms - unter Bildung von Wasser - über die Verbindung $[\text{FeO}]^{3+}$ geschieht. Das Substrat wird nun oxygeniert oder dehydrogeniert. An die so veränderten Moleküle können die Transferasen der Phase II anknüpfen und das Substrat mit polaren Verbindungen konjugieren (Coon et al. 1996).

90 bis 95% aller CYP sind bei Säugern in der Leber lokalisiert. Auch im Darm tragen sie mit 1 bis 2% des Gesamtanteils nicht unerheblich zur Biotransformation bei. Weitere Organe mit Nachweisbarkeit von CYP sind Lunge und Nieren. Von den zahlreichen CYP-Familien mit ihren Subfamilien und Isoformen sind beim Menschen besonders die Familien CYP 1 bis 3 für den Fremdstoffmetabolismus von Bedeutung. Mit einem Anteil von 30% stellt das CYP3A4 dabei nicht nur mengenmäßig die größte Gruppe dar (im Darm beträgt der Anteil sogar 70%). Etwa 70% der Xenobiotika werden mit Hilfe dieses Isoenzyms verstoffwechselt. Die Familie mit den meisten Mitgliedern stellt bei den Säugern jedoch CYP2. Beim Menschen sind bisher acht Vertreter daraus beschrieben worden (Gibson et al. 2002). Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe - CYP2B - wurde in der vorliegenden Arbeit auf seine Induzierbarkeit untersucht.

2.3 Induktion von CYP

Charakteristisch für die CYP ist die relativ geringe basale Expression in Abwesenheit des entsprechenden Substrats sowie die Fähigkeit, bei vorhandenem Substrat in der Expression stark anzusteigen. Diesen Vorgang nennt man Induktion. Er ist für gewöhnlich gewebe-spezifisch, schnell, dosisabhängig und wieder reversibel, wenn das Substrat (Induktor) dann ausbleibt (Handschin & Meyer 2003). Die „Animal-Plant-Warfare“-Hypothese geht davon aus, dass sich die Induzierbarkeit verschiedener CYP-Formen auf einen evolutiven Prozess zurückführen lässt, der auf einer Interaktion zwischen Tieren und Pflanzen beruht. Demnach entwickelten einige Pflanzen einen Sekundärstoffwechsel mit Produktion toxischer Substanzen, welche einen gewissen Fraßschutz und damit einen evolutiven Vorteil gegenüber anderen Pflanzen boten. Infolgedessen entwickelten einige Tiere ein CYP-System, welches induzierbar und in der Lage war, diese toxischen Substanzen zu metabolisieren (Yamada et al. 2006). Strychnin beispielsweise - ein toxisches Alkaloid aus *Strychnos nux-vomica* - führt bei Ratten, einer hierfür resistenten Spezies, zu einer starken

Induktion von CYP2B1/2. Hingegen kommt es bei Tieren mit nur schwacher Induktivität dieser CYP-Form (Hunde, Katzen, Mäuse, Kaninchen) zu Vergiftungserscheinungen (Fujisaki et al. 1994).

Folgende klinische und toxikologische Beobachtungen lassen sich auf eine Induktion oder Inhibition von CYP durch Medikamente oder andere Xenobiotika zurückführen: pharmakokinetische Toleranz, Arzneimittelwechselwirkungen, steigendes Lebergewicht und/oder Proliferation des Endoplasmatischen Retikulums sowie die Entwicklung von Leber- und Schilddrüsentumoren. Dies erklärt das große Interesse daran, molekulare Mechanismen von CYP-Induktion oder -Hemmung im Detail verstehen zu wollen (Parkinson 1996).

Es zeigte sich, dass bestimmte CYP-Isoformen in ihrer Expression und Induzierbarkeit miteinander korrelieren (Forrester et al. 1992). Dabei ließen sich bestimmte Induktionsmuster durch pharmakologisch ähnliche Substanzen beobachten. Diese Muster machen eine Einteilung in bisher fünf Induktorklassen möglich (**Tabelle 2.1**), die Modellcharakter für die Induzierbarkeit bestimmter CYP-Systeme besitzen (Handschin & Meyer 2003).

Tabelle 2.1: Fünf CYP-Induktorklassen (nach Handschin & Meyer 2003):

Induktorklassen / Prototypen	induzierte CYP-Isoenzyme
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, TCDD	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
Phenobarbital-Typ	CYP2B, CYP2C, CYP3A
Rifampicin-, Dexamethason-Typ	CYP3A, CYP2C, CYP2B
Ethanol, Isoniazid	CYP2E1
Clofibrat-Typ	CYP4A

Die Induktion der verschiedenen CYP-Isoformen beruht auf unterschiedlichen molekularen Mechanismen. In den meisten Fällen kommt es zur Bindung des Induktors an einen Rezeptor (auch „transcriptional factor“ oder „trans-acting factor“ genannt), welcher sich wiederum an bestimmte DNA-Sequenzen in der Enhancer-Region von CYP-Genen bindet. Diese regulatorischen Sequenzen, die korrespondierende Elemente darstellen, werden auch „cis-acting factors“ genannt.

Es gibt drei wichtige Methoden, auf die CYP-Expression im Lebergewebe zu schließen und gegebenenfalls einen Induktionsprozess nachzuweisen. Auf enzymatischer Ebene nutzt man zum Beispiel die Substratspezifität der verschiedenen CYP-Formen und kann vom Substratumsatz auf die Menge der Monooxygenasen schließen. Zur Bestimmung der CYP2B1/2-Aktivität ist beispielsweise die Pentoxyresorufin-O-Dealkylierung (PROD) als spezifische Reaktion geeignet (Pohl & Fouts 1980). Sie wurde bei den Versuchen dieser Arbeit angewandt.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung der CYP-Expression stellt die Immunhistochemie dar. Dabei werden zum Beispiel fluoreszierende Antikörper aus Kaninchenserum gegen das zu untersuchende CYP eingesetzt. Anschließend wird das Gewebe fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Diese Methode bietet den Vorteil, einen Eindruck über die Lokalisation von Induktionsprozessen gewinnen zu können. Dies wurde auch an Rattenleberschnitten *in vitro* untersucht (Lupp et al. 2001).

Die wohl empfindlichste Methode, um auf die CYP-Expression zu schließen und einen Induktionsprozess nachzuweisen, ist die Bestimmung der jeweiligen CYP-mRNA. Diese kann beispielsweise mittels RT-PCR amplifiziert werden. Eine Quantifizierung ist mit kompetitiver RT-PCR möglich. Am Beispiel von CYP2B1 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die spezifische mRNA in unbehandelten Rattenleberschnitten über 24 Stunden Inkubation stabil bleibt sowie durch Phenobarbital (PB) *in vitro* schnell und deutlich induzierbar ist. (Müller et al. 2000). Auch diese Methode wurde bei den Versuchen dieser Arbeit angewandt. Im Folgenden soll kurz auf die molekularen Mechanismen des Induktionsprozesses von CYP2B eingegangen werden, welches in dieser Arbeit auf seine Induzierbarkeit untersucht wurde.

2.3.1 Induktion von CYP2B

Die Mechanismen, die zu einer Induktion der CYP2B-Subfamilie führen, sind gegenwärtig noch nicht vollständig verstanden. Offensichtlich spielt eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle. So gibt es beispielsweise eine Korrelation zwischen der Halbwertszeit von Barbituraten im Blut und ihrem Vermögen zur CYP-Induktion (Ioannides & Parke 1975). Auch scheinen gewisse endogene Faktoren hinsichtlich Aktivierung oder Suppression eine Rolle zu spielen. Diskutiert wird unter anderem das Mitwirken von Steroiden. Beispielsweise verstärken Glukokortikoide die durch Phenobarbital (PB) vermittelte CYP2B-Induktion (Schuetz et al. 2000). Des Weiteren gibt es Vermutungen, dass CYP2B selbst an der Induktion beteiligt ist (Waxman & Azaroff 1992).

In der DNA von Mäusen ließ sich eine PB-reaktive Einheit mit einer Größe von 51 bp (PB-Responsive Enhancer Module (PBREM)) ermitteln, die in Interaktion mit einer Vielzahl von Xenobiotika tritt. Hierbei handelte es sich um zwei DR-4-Elemente (Direct Repeat), die durch einen mutmaßlichen nukleären Faktor (NF-1) getrennt sind sowie ein weiteres DR-4-Element 8,5 kb strangaufwärts. Eine seitenspezifische Mutation in DR-4 führte zu einem deutlichen Verlust von Induzierbarkeit (Honkakoski & Negishi 1998). Die Bindung eines als CAR bezeichneten Rezeptors (Constitutive Androstane Receptor) an eines dieser DR-4-Elemente (auch als Nuclear Receptor (NR) bezeichnet) spielt eine entscheidende Rolle beim Induktionsmechanismus. Dabei kommt es zur Bildung eines Heterodimers mit RXR (Retinoid X Receptor). Bei CAR- oder RXR-KO-Mäusen war beispielsweise keinerlei Induktion von Cyp2b10 durch PB auslösbar (Ueda et al. 2001). Allerdings gibt es nur wenige Substanzen, die direkt an CAR binden können. Auch PB, ein starker Induktor von CYP2B, ist dazu nicht in der Lage. So bleiben noch zahlreiche Fragen hinsichtlich des Mechanismus einer CAR-Aktivierung durch Xenobiotika und damit zur CYP2B-Induktion zu klären (Handschin & Meyer 2003, Yamada et al. 2006).

2.3.2 CYP2B-Modellinduktor Phenobarbital (PB)

PB gehört zur Gruppe der Barbiturate. Es löst eine starke Induktion bei CYP2B aus (Waxman & Azaroff 1992). Im Rahmen dieser Dissertation wurde es als Modellschubstanz für Induktionsversuche an diesem System eingesetzt (**Tabelle 2.1**). Die chemische Formel lautet: $C_{12}H_{12}N_2O_3$ (**Abbildung 2.1**) (bzw. $C_{12}H_{11}N_2NaO_3$ für das Natriumsalz PB-Na).

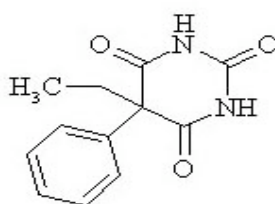


Abbildung 2.1: Strukturformel von Phenobarbital

Das Molekulargewicht beträgt 232,24 für PB und 254,22 für PB-Na. Das Natriumsalz ist etwa 100-mal löslicher in Wasser und wurde aus diesem Grund bei den eigenen Versuchen verwendet. In der klinischen Praxis wird PB noch als Antikonvulsivum eingesetzt. Aufgrund seiner ausgeprägten unerwünschten Wirkungen (Abhängigkeitspotential, geringe therapeutische Breite, Atemdepression, ausgeprägte Arzneimittelwechselwirkungen) hat es allerdings seine Bedeutung als Hypnotikum verloren (Forth et al. 2001). Die Plasmahalbwertszeit von PB beträgt bei Ratten zwischen 10 und 25 Stunden. Schwerere Tiere haben eine vergleichsweise geringere PB-Clearance (Brouwer et al. 1984).

2.4 Modelle zur Untersuchung der CYP-Induktion

Im Folgenden sind die unterschiedlichen Möglichkeiten dargestellt, mit denen man die CYP-Induktion untersuchen kann. Dabei ist vornehmlich zwischen In-vivo- und In-vitro-Modellen zu unterscheiden.

2.4.1 *In-vivo-Modelle*

Bei In-vivo-Modellen erfolgt die Applikation des zu untersuchenden Agens am lebenden Tier. Am Ende des Beobachtungszeitraumes werden die Lebern zur weiteren Aufarbeitung entnommen. Dabei entspricht die Leber eines jeden Tieres einer einzigen Probe.

Omiecinski et al. (1985) belegten bei Ratten einen signifikanten Anstieg von P-450b/e-mRNA (entspricht in neuer Nomenklatur CYP2B1/2 und CYP2C (Nebert et al. 1991)) nach Behandlung mit PB in vivo bei sehr niedrigem Ausgangsniveau. Mithilfe immunologischer Methoden wurde bei In-vivo-Versuchen auch die regionale Expression unterschiedlicher CYP-Formen unter konstitutiven und induzierten Bedingungen untersucht. CYP2B1/2 fand sich dabei vor allem in den periportalen Hepatozyten und ließ sich nach PB-Behandlung dort vermehrt nachweisen (Bühler et al. 1992). Bei In-vivo-Versuchen mit unterschiedlichen PB-Derivaten (m-Azido-PB und p-Azido-PB) zeigte sich der vergleichsweise größte Induktionseffekt bei Applikation von nicht modifiziertem PB. Der Induktionsnachweis erfolgte hierbei anhand der Testosteronhydroxylierung (Shinohara et al. 1997).

2.4.2 *In-vitro-Modelle*

Die Entwicklung von In-vitro-Modellen ermöglicht die Reduktion der Versuchstierzahl. Dadurch lässt sich im Sinne des Tierschutzgesetzes Leiden der Tiere vermindern. Durch die höhere Effizienz (es können mehr Substanzen in kürzerer Zeit getestet werden bei weit geringerer Versuchstierzahl) lassen sich zudem Kosten einsparen. Zur Erzeugung einer Induktion in vitro sind nur Modelle mit funktionsfähigem Genexpressions- und Proteinsyntheseapparat geeignet. Zwei wichtige Modelle werden nachfolgend kurz beschrieben.

2.4.2.1 Kulturen primärer Hepatozyten

Zur Untersuchung des Einflusses von Xenobiotika auf das hepatische CYP-System haben sich vor allem Kulturen von primären Hepatozyten als In-vitro-Modell etabliert. Sie bieten die Möglichkeit, große Mengen verschiedener Substanzen unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen (Worboys & Carlile 2001). Jedoch zerstört man unter Einsatz digestiver Substanzen die Gewebearchitektur und löst mitunter Membranschäden aus. Der Verlust der Gewebestruktur hat direkten Einfluss auf die Ausprägung der gewebespezifischen mRNA-Transkription (Clayton et al. 1985). Es werden Veränderungen der Genexpression ausgelöst, so dass dieses Modell die In-vivo-Verhältnisse der Leber nicht mehr hinreichend widerspiegelt (Boess et al. 2003). Des Weiteren ist man auf komplizierte Kultursysteme angewiesen, um einer schnellen Entdifferenzierung der Parenchymzellen in vitro entgegenzuwirken. Sie erfordern vom Untersucher ein hohes Maß an Erfahrung. Zudem benötigen frisch angelegte Hepatozytenkulturen eine Regenerationszeit von 48 bis 72 Stunden, bevor Versuche zur Induktion durchgeführt werden können. Diese Versuche wiederum benötigen dann noch einmal einen ähnlichen Zeitraum (Bjornsson et al. 2003). All diese Aspekte machen Hepatozytenkulturen zu einem relativ aufwändigen und kostenintensiven Verfahren. Daraus ergibt sich das Interesse an der Entwicklung von alternativen Verfahren. Eine dieser Alternativen stellen Präzisionschnitte von Lebergewebe dar. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt und sollen im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

2.4.2.2 Präzisionsleberschnitte

Bereits im Jahr 1923 arbeitete Otto Warburg mit Leberschnitten, die er von Hand mit Hilfe einer Rasierklinge anfertigte. Auch Sir Hans Krebs führte 1933 pharmakologische Untersuchungen auf diese Art durch (Warburg 1923, Krebs 1933). Diese ersten In-vitro-Untersuchungen des Fremdstoffmetabolismus der Leber waren beeinträchtigt durch zu dicke, uneinheitliche Gewebeschnitte, bei denen - bedingt durch die hohe Stoffwechselaktivität der Leber, einhergehend mit hohem Sauerstoffverbrauch - auch bei kurzen Inkubationszeiten zentrale Gewebedestruktionen auftraten.

In den frühen 70er Jahren hatten sich vornehmlich isolierte Hepatozyten als In-vitro-Untersuchungsmethode des Fremdstoffmetabolismus bewährt. Die zu dieser Zeit vorhandenen, kommerziell angebotenen Schneidegeräte auf Mikrotombasis (McIlwain

tissue chopper, Vibratome) waren allerdings noch nicht in der Lage, das Gewebe unter kontrollierten Bedingungen in einem physiologischen Puffer zu schneiden (Ekins 1996). Erst mit Entwicklung des Krumdieck tissue slicer (Alabama Research & Development, Munford) und der sich daraus ergebenden Möglichkeit, konstant dünne Schnitte (100 bis 1000 μm) schnell und weitgehend atraumatisch innerhalb eines physiologischen Mediums herzustellen, gewannen Gewebeschnitte als In-vitro-Technik wieder an Bedeutung (Krumdieck 1980, Smith et al. 1985). Einen weiteren wichtigen Schritt stellte die Optimierung der Nährmedien dar, in denen die Schnitte inkubiert werden. Bis zu einer Inkubationszeit von 72 Stunden ließ sich die Vitalität der Gewebeschnitte hinreichend aufrechterhalten (Lake et al. 1993, Lerche-Langrand & Toutain 2000).

Als Parameter zur Vitalitätsprüfung wurden Kaliumgehalt, LDH-Verlust, Albuminsynthese sowie Substratumsatz herangezogen. Dabei erwies sich eine ausreichende Sauerstoffzufuhr von entscheidender Bedeutung (Drobner et al. 2000). Die optimale Schnittdicke für einen schnellen Nährstoff- und Gasaustausch wurde für 250 μm ermittelt. Schnitte mit einer Dicke $> 500 \mu\text{m}$ wiesen sehr schnell zentrale ischämische Nekrosen auf, während bei Schnittdicken $< 200 \mu\text{m}$ das Verhältnis von geschädigten Zellen an der Oberfläche zu intakten Zellen zu groß wurde (Dogterom 1993). Histomorphologisch zeigte sich über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden ein weitgehend vitales Lebergewebe. Innerhalb von 6 Stunden war eine zunehmende Vakuolisierung der periportalen Hepatozyten in der Mitte der Schnitte zu beobachten, einhergehend mit einem Glykogenverlust in den betreffenden Zellen. Bei Inkubationszeiten von mehr als 24 Stunden traten dann vor allem im Zentrum der Schnitte vereinzelt Zellnekrosen auf. Weitere 24 Stunden später fand sich typischerweise ein zentrales Band mit Koagulationsnekrose, welches von vitalen Hepatozyten umgeben war (Lupp et al. 2001, Neupert et al. 2003, Neupert 2006).

Die Vorteile dieser so genannten Präzisionsleberschnitte gegenüber Zellkulturen sind zum einen in der erhaltenen azinären Organarchitektur zu sehen, die in ihrer funktionalen Eigenschaft der natürlichen Leberfunktion näher kommt. Zum anderen konnte man auf die Verwendung von digestiven Enzymen zur Isolation von Hepatozyten verzichten, welche im Verdacht stehen, qualitative und quantitative Veränderungen im Fremdstoff-metabolismus zu verursachen (Powis et al. 1989). Das Leberparenchym weist eine deutliche Heterogenität der Hepatozyten entlang der portozentralen Achse bezüglich Ultrastruktur und Enzymaktivität auf, welche mit unterschiedlichen zellulären Funktionen in unterschiedlichen Zonen der Leberlobuli einhergeht (Gebhardt 1992). Die Interaktion

zwischen verschiedenen Zellarten (z.B. Bindegewebszellen, Kupfferzellen) trägt wesentlich zur Gesamtfunktion bei. Eine intakte Gewebearchitektur spiegelt diese Heterogenität eher wider, als beispielsweise Hepatozytenkulturen.

Ein wichtiger Aspekt bei der Arbeit mit Gewebeschnitten ist die Möglichkeit einer Langzeitaufbewahrung. Im Besonderen menschliches Material steht nicht beliebig zur Verfügung. Hierbei hat sich am ehesten die Kryokonservierung bewährt (Glöckner et al. 1998). Ein Vorteil gegenüber In-vivo-Versuchen besteht darin, dass behandelte Schnitte und Kontrollschnitte von einer Leber stammen können. Damit wird das Problem der interindividuellen Variabilität reduziert. Des Weiteren benötigt man geringere Dosen der Testsubstanz für die Untersuchung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Außerdem sind weniger Variablen zu berücksichtigen, als bei einem komplizierten Organismus in vivo (Lerche-Langrand & Toutain 2000). Die Nachteile von Gewebeschnitten werden vor allem in der inadäquaten Penetration hydrophiler Substrate aus dem Medium ins Gewebe sowie geschädigten Zellen an den Schnittkanten und einer zeitlich limitierten Verfügbarkeit nach Präparation gesehen (Ekins 1996).

Nach der Schnitt-Präparation folgt im Allgemeinen die Inkubation in einem Medium, welches zum einen die Gas- und Nährstoffversorgung gewährleistet und zum anderen mit den zu testenden Substanzen versetzt werden kann. Hier haben sich eine Reihe unterschiedlicher Systeme bewährt, die sich in ihren Vor- und Nachteilen einander weitgehend entsprechen. Zu unterscheiden sind vornehmlich Kurzzeitstudien mit einer Inkubationszeit von weniger als 3 Stunden (diese werden überwiegend für metabolische Untersuchungen angewandt) von Langzeitstudien mit einer Inkubationszeit von mehr als 3 Stunden. Hierbei werden höhere Anforderungen an das Inkubationsmedium bezüglich Nährstoffgehalt und Sauerstoffversorgung gestellt. Eine Zusammenstellung findet sich bei Lerche-Langrand & Toutain (2000). Für die vorliegende Arbeit kam ein Inkubationssystem zum Einsatz, bei dem die Gewebeschnitte in 25-ml-Erlenmeyerkolben mit 5 ml Williams Medium E (WME) unter ständiger Carbogenbegasung (95% O₂, 5% CO₂) und bidirektionaler Bewegung bei 37°C über 24 Stunden inkubiert wurden. Es zeichnet sich durch eine einfache Durchführbarkeit und hohe Reproduzierbarkeit aus (Müller et al. 1998).

Bezüglich der Übertragbarkeit von Beobachtungen aus In-vitro-Versuchen auf den lebenden Organismus ließ sich bei der Untersuchung von 190 leberspezifischen Genen eine >80%ige Korrelation zwischen Lebergewebe in vivo und Leberschnitten feststellen, die damit wesentlich höher war als zwischen Hepatozytenkulturen und Lebergewebe in vivo (Boess et al. 2003, Jessen et al. 2003). Allerdings kann die metabolische Aktivität von Gewebeschnitten nicht direkt auf die In-vivo-Situation extrapoliert werden (Lerche-Langrand & Toutain 2000).

2.5 CYP2B-Induktion in Präzisionsleberschnitten

Im folgenden Abschnitt soll der aktuelle Stand über die Verwendung von Präzisionsleberschnitten unbehandelter Ratten zur Untersuchung der Induzierbarkeit von CYP2B durch PB dargestellt werden. Dieser bildete die Basis der nachfolgenden Untersuchungen.

Lake et al. (1993) inkubierten Leberschnitte unbehandelter Ratten über einen Zeitraum bis 72 Stunden unter anderem mit PB und wiesen anhand von Monooxygenasereaktionen (ECOD, BROD) eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber den Kontrollschnitten nach. Dieser Induktionseffekt war konzentrationsabhängig. Auch zeigte sich ein Aktivitätsverlust über den Inkubationszeitraum, wenn kein Induktor zugeführt wurde.

Müller et al. (2000) führten neben einer Aktivitätsbestimmung anhand der PROD auch eine Messung der CYP2B1-mRNA-Konzentration durch. Bei beiden Verfahren zeigte sich ein Induktionseffekt bereits nach 24 Stunden Inkubation mit PB in vitro. Im Gegensatz zur CYP-Aktivität fiel die mRNA-Konzentration in unbehandelten Schnitten während der Inkubation nicht ab, wenn kein Induktor zugefügt wurde. Des Weiteren stellte sich der Induktionseffekt auf mRNA-Ebene rascher ein und war deutlicher ausgeprägt. Vergleichbare Ergebnisse einer CYP2B1-mRNA-Induktion erhielten auch Martignoni et al. (2004), Meredith et al. (2003) und Pan et al. (2002) mithilfe der Real-time-RT-PCR. Immunhistochemisch konnte bei Leberschnitten nach 24 Stunden PB in vitro ein vermehrter Anteil von CYP2B1 nachgewiesen werden. Dieser war vor allem in den am besten versorgten Zellen an den Schnitträndern und um die größeren Portal- und Zentralvenen herum lokalisiert (Lupp et al. 2001).

Bezüglich des Problems der Übertragbarkeit vom Tiermodell auf den Menschen stellt sich im Weiteren die Frage, inwieweit sich auch Organschnitte aus menschlichem Material für ein In-vitro-Modell eignen. Zum Beispiel ist Rifampicin einer der stärksten Induktoren des menschlichen CYP3A4, hat jedoch nur einen geringen Effekt auf die CYP3A-Subfamilie bei Ratten und Mäusen, wohingegen PCN ein potenter Induktor bei CYP3A von Ratten und Mäusen, nicht aber bei menschlichem CYP3A ist (Parkinson 1996, Waxman 1999). Mit der Möglichkeit der Nutzung von Humanleberschnitten könnten diese Speziesunterschiede umgangen werden. Gewebe hierfür ließe sich beispielsweise aus Operationspräparaten, Biopsien oder Leichen gewinnen. Die Ausprägung der verschiedenen CYP-Formen in Humanleberschnitten unterliegt jedoch einer großen interindividuellen Variabilität. Diese zeigt sich sowohl in Leberzellkulturen als auch bei Leberschnitten. Trotzdem können Induktionen aller relevanten CYP-Subfamilien durch entsprechende Substanzen (z.B. Beta-Naphthoflavon (BNF), PB, Rifampicin) nachgewiesen werden. Das Signifikanzniveau wird aber wegen der großen Streubreite nicht immer erreicht (Edwards et al. 2003). Über einen Inkubationszeitraum von 72 Stunden lassen sich relativ stabile CYP mit einer Halbwertszeit von 70 bis 104 Stunden (2C9, 2D6, 3A4, 4A11) von eher instabilen CYP mit Halbwertszeiten zwischen 23 bis 36 Stunden (1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2E1, 3A5) unterscheiden (Renwick et al. 2000).

In Humanhepatozyten wurde neben einer dosisabhängigen Induzierbarkeit auch ein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen CYP-Ausgangsniveau und der nachfolgenden In-vitro-Induzierbarkeit beobachtet (Lindley et al. 2002, McCune et al. 2000). Bei der Nutzung humaner In-vitro-Modelle (inklusive Präzisionsleberschnitten) ergeben sich somit Probleme für die Standardisierbarkeit der Versuchsreihen, weil der jeweilige CYP-Expressionszustand unbekannt ist. Faktoren wie Geschlecht, Alter, genetischer Polymorphismus, Ernährung, Krankheit und Medikamenteneinnahme führen zu einem individuell unterschiedlichen CYP-Expressionsmuster (Gibson et al. 2002). Für die Nutzung von Humanleberschnitten als In-vitro-Modell zur CYP-Induktion sollte Kenntnis darüber bestehen, ob eine Induktion in vitro auch dann möglich ist, wenn vorher eine In-vivo-Induktion der Spenderleber stattgefunden hat. Zur Untersuchung dieser Problematik ist zunächst die Etablierung und Verwendung eines standardisierten Tiermodells sinnvoll. Daraus lassen sich dann wichtige Erkenntnisse für die weitere Entwicklung eines In-vitro-Modells mit Humanleberschnitten gewinnen.

Untersuchungen zur Induzierbarkeit in vitro bei vorheriger Induktion in vivo wurden bisher für CYP1A1 und CYP3A1 durchgeführt. 24 Stunden nach oraler Applikation von BNF in vivo wurden in den jeweiligen Rattenleberschnitten sowohl eine erhöhte ECOD als auch eine erhöhte CYP1A1-mRNA-Konzentration beobachtet. Eine zusätzliche Behandlung der Leberschnitte dieser vorbehandelten Tiere mit BNF in vitro führte trotzdem auf beiden Ebenen (ECOD und CYP1A1-mRNA-Konzentration) zu einer Induktion im Vergleich zu den Kontrollschnitten (Glöckner et al. 2001). Auch durch Dexamethason in vivo induziertes CYP3A1 ließ sich in Leberschnitten durch nachfolgende Behandlung mit Dexamethason in vitro sowohl auf Enzymaktivitäts- als auch auf mRNA-Ebene gegenüber den Kontrollschnitten erneut induzieren. Dies war bei der Testosteronhydroxylierung teilweise abhängig vom Ausgangsniveau (Lieder 2007). Für die Induzierbarkeit von CYP2B durch PB nach vorheriger Induktion des Spendergewebes in vivo fehlen bisher entsprechende Untersuchungen. Sie sind Ziel der vorliegenden Arbeit.

3 Ziele der Arbeit

Mit PB als Modellinduktor von CYP2B1 (Waxman & Azaroff 1992) war bei männlichen Ratten eine Induktion der enzymatischen Aktivität und der CYP2B1-mRNA-Expression sowohl *in vivo* (Agrawal & Shapiro 2003), als auch an Präzisionsschnitten von Rattenlebern *in vitro* (Müller et al. 2000) nachweisbar. Ungeklärt blieb bisher, inwieweit sich eine Induktion durch PB *in vivo* auf die nachfolgende Induzierbarkeit des Spendergewebes *in vitro*, speziell in Leberschnitten, auswirkt.

Dies ist von besonderer Bedeutung hinsichtlich des Ziels, auch humanes Lebergewebe für pharmako-toxikologische Untersuchungen nutzen zu können. Bei dem hierfür zur Verfügung stehenden Material ist nahezu immer davon auszugehen, dass es *in vivo* einer Vielzahl an CYP-modulierenden Substanzen ausgesetzt war und das Ausgangsniveau der Enzymexpression somit unbekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde folgenden Fragen nachgegangen:

1. Lässt sich eine vorherige CYP2B1-Induktion *in vivo* durch PB später an Leberschnitten (*ex vivo*) auf Enzymaktivitäts- (PROD) bzw. mRNA-Expressionsebene (kompetitive RT-PCR) nachweisen? Wenn ja, wie stark fällt diese aus?
2. Daraus abgeleitet wurde untersucht, wie lange sich nach PB-Behandlung *in vivo* die erwartete Steigerung der PROD-Aktivität und CYP2B1-mRNA-Expression in Rattenleberschnitten *in vitro* nachweisen lässt, d.h. wie schnell sich der Abklingprozess nach Induktion von CYP2B1 *in vivo* vollzieht bzw. wie lange nach Ende der PB-Vorbehandlung die Induktion noch in den Leberschnitten sichtbar ist. Zu diesem Zweck erfolgte die Entnahme des Lebergewebes bei einem Teil der Versuchstiere 24 Stunden nach 3-maliger PB-Gabe (Standardvorgehen zur CYP2B1-Induktion der Ratte *in vivo*), bei einem anderen Teil aber erst 48 oder 72 Stunden nach Ende der Vorbehandlung.
3. Es wurde erwartet, dass sich durch unterschiedlich lange Latenz zwischen Ende der PB-Gabe und Leberentnahme auch Unterschiede in der CYP2B1-Aktivität herausbilden müssten (am höchsten 24 Stunden nach der letzten Applikation, bei längerer Latenz wieder abnehmend). Von besonderem Interesse war nun die Frage, welchen Einfluss unterschiedliche CYP2B1-Expressionszustände *in vivo* auf die Möglichkeit einer nachfolgenden (erneuten) Induzierbarkeit durch PB an Rattenleberschnitten *in vitro*

haben. Lässt sich bei hohem CYP2B1-Ausgangsniveau des Spendergewebes durch PB-Behandlung *in vivo* ein zusätzlicher Induktionseffekt durch Inkubation der Rattenleberschnitte in PB-haltigem Medium erreichen? Wenn dies nicht der Fall ist, ab welchem Ausgangsniveau, d.h. mit welcher Latenz zwischen Ende der Vorbehandlung und Leberentnahme, ist eine erneute In-vitro-Induktion wieder möglich?

Die Ergebnisse sollen Erkenntnisse darüber liefern, inwieweit Leberschnitte dafür geeignet sind, Substanzen auf ihr Induktionspotential *in vitro* zu testen, wenn das Spendergewebe bereits *in vivo* einem Agens der entsprechenden Induktorkategorie (hier PB) ausgesetzt war und entsprechend einen höheren Expressionszustand der jeweiligen CYP-Isoform (hier CYP2B1) aufweist. Das Ziel der Arbeit war dabei nicht die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge des Induktionsmechanismus, sondern die Bewertung von Versuchsergebnissen am komplexen In-vitro-Modell „Präzisionsleberschnitt“ mit *in-vivo*-nahen Eigenschaften unter Berücksichtigung der Eigenschaften des Spendergewebes.

4 Material und Methoden

4.1 Gewinnen und Behandeln von Gewebematerial aus Versuchstieren

4.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche, etwa 40 Tage alte WISTAR-Ratten (Han: WIST) aus der Auszucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Tag-Nacht-Rhythmus: 12/12 Stunden; Temperatur: ca. $22 \pm 2^\circ\text{C}$; relative Luftfeuchte: $\geq 50 \pm 10\%$; Standardfutter: Pellets Altromin R 316 ad libitum; Leitungswasser ad libitum; Lebensraum: Plastikschaalen mit Fasereinstreu (Altromin GmbH, Lage)).

4.1.2 Vorbehandlung der Versuchstiere

Zur Vorbehandlung wurde den Versuchstieren PB (als Natriumsalz), gelöst in physiologischer (0,9%iger) Kochsalzlösung, intraperitoneal appliziert (6 g PB/ml NaCl-Lösung). Die Applikation von 60 mg PB/kg KG erfolgte 3x in einem Abstand von jeweils 24 Stunden. Weitere 24, 48 bzw. 72 Stunden nach der letzten PB-Applikation wurden die Tiere in leichter Ether-Narkose dekapitiert, um die Leber zu gewinnen.

4.1.3 Herstellen der Leberschnitte

Nach dem Eröffnen des Abdominalraumes mit einer Präparierschere wurde die Leber herauspräpariert, ohne diese mit Magen- bzw. Darminhalt in Kontakt zu bringen. Anschließend folgte die zweimalige Spülung und weitere Aufbewahrung der Leber in Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) (**Tabelle 4.1**).

Mithilfe eines scharfen Stanzzylinders wurden Gewebezyylinder mit einem Durchmesser von 8 mm hergestellt und im Krumdiek Tissue Slicer (Alabama Research and Development, Munford, **Abbildung 4.1**) zu Schnitten von 200 bis 250 μm Dicke verarbeitet. Das Lebergewebe befand sich dabei ständig in KHP, mit dem das Gerät befüllt war.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung von Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHP), der außerdem mit Carbogen begast wurde.

Bestandteile	Konzentration in der Arbeitslösung
NaCl	120 mM
KCl	4,80 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,20 mM
MgSO_4	1,20 mM
NaHCO_3	25 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,25 mM
<i>am Versuchstag Zusatz von:</i>	
HEPES-Puffer	12,6 mM (=3g/l KHP)
Gentamicin	50 mg/l KHP
Ampicillin-Natrium	10 mg/l KHP



a)



b)

Abbildung 4.1: Krumdieck Tissue-Slicer: a) zusammengesetzt, b) Einzelelemente

(aus Alabama Research & Development, Munford, USA, <http://www.alspi.com>)

4.1.4 Inkubation der Leberschnitte

Als Inkubationsmedium diente Williams-Medium E (WME) mit den in **Tabelle 4.2** genannten Zusätzen. Dieses wurde zu je 5 ml auf 25 ml-Erlenmeyerkolben aufgeteilt, dort noch einmal mit Carbogen begast und mit einem Glasstopfen verschlossen.

Tabelle 4.2: Zusätze zum Inkubationsmedium WME, das außerdem mit Carbogen begast wurde.

L-Glutamin	29,2 mg/100 ml (2 mM)
Insulin (Berlinsulin® H Normal U-40 ⁰)	345 µl/100 ml (1 µM)
Gentamicin (Gentamicin ratiopharm®)	50 mg/l
Tylosintartrat (als Trockensubstanz)	100 mg/l
Ampicillin-Natrium (Trockensubstanz)	10 mg/l

Für die Versuche zur In-vitro-Induktion von CYP2B1 wurden 10 µl PB-Na (2,54 mg/ml WME) hinzu gegeben, welches somit im Inkubationsmedium 10^{-4} M vorlag. Diese Konzentration hatte sich bei Vorversuchen als geeignet erwiesen, die höchste Induktion der PROD in vitro auszulösen, welche durch 5×10^{-5} M noch nicht und durch 10^{-3} M nicht mehr im gleichen Ausmaß erreicht wurde (nicht dargestellt). Parallel wurden stets Versuchsansätze mit Kontrollschnitten ohne PB-Zusatz mitgeführt.

Die Inkubationsgefäße wurden mit jeweils 4 Schnitten (\approx 40 mg Lebergewebe) bestückt, und anschließend in einem Schüttel-Wasserbad (SW-21/SW-21D, SW-21C, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) unter ständiger bidirektionaler Bewegung (ca. 100/min) konstant bei 37°C inkubiert. Während der gesamten Inkubation erfolgte eine leichte, kontinuierliche Begasung jedes Kölbchens mit Carbogen.

Nach 2 Stunden Inkubation wurden die ersten Schnitte entnommen (2h-Werte) und weiter verarbeitet. Für die übrigen Schnitte erfolgte ein Medienwechsel durch Überführung in neue Kolben mit gleicher Bestückung und weitere Inkubation für 4 Stunden bzw. 22 Stunden (6- bzw. 24h-Werte).

Das folgende Schema gibt einen Überblick über die Versuchsgruppen und den Versuchsablauf (**Abbildung 4.2**).

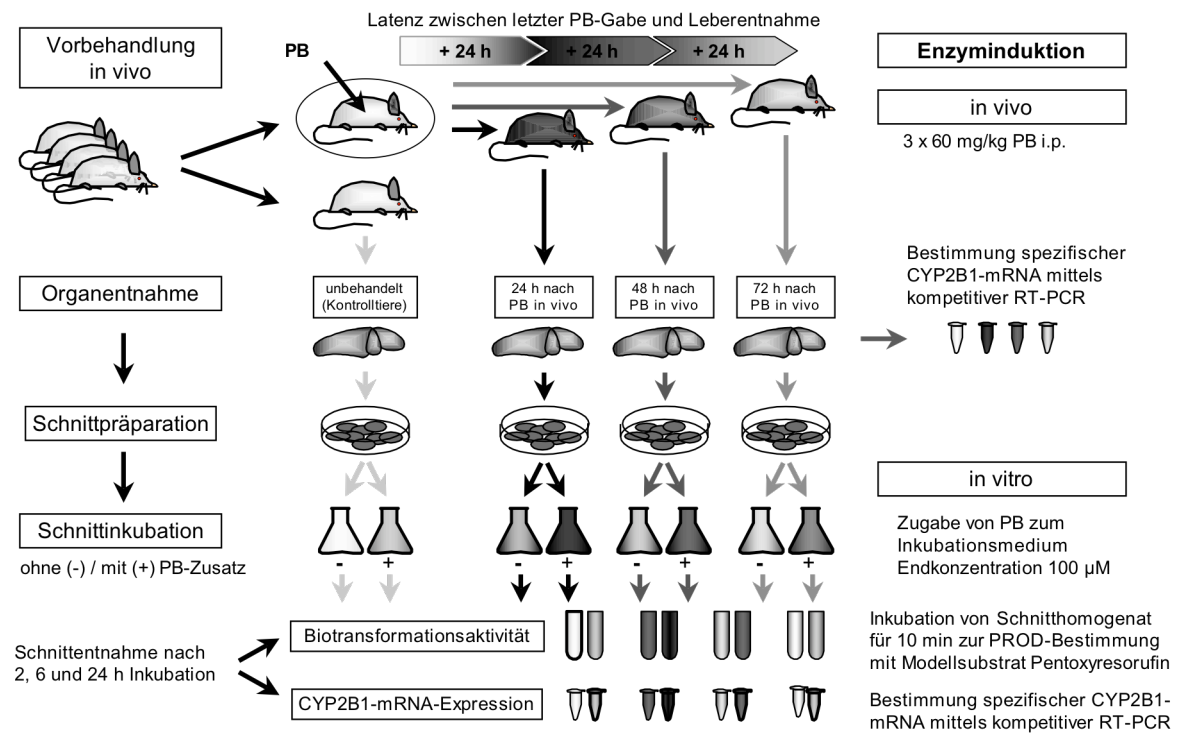


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns

4.1.5 Herstellung von Homogenat aus Leberschnitten

Ein Teil Lebergewebe wurde mit 5 Teilen Na-Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,44) durch Ultraschall homogenisiert (Ultraschall Branson Sonifier 450, Branson Ultrasonics Corporation, USA). Anschließend erfolgte eine weitere 1:5-Verdünnung dieses Stammhomogenats mit Na-Phosphatpuffer. Aus dieser 1:30-Homogenat-Verdünnung wurden später bei der Bestimmung der Biotransformationsaktivität je Ansatz 0,1 ml verwendet. Bis zur Bestimmung wurde das Homogenat bei -80°C zwischengelagert.

4.2 Bestimmung der CYP2B-Induktion an Rattenleberschnitten

Für die Bestimmung der CYP2B-Induktion kamen zwei grundlegende Verfahren zum Einsatz. Zum einen erfolgte die Messung des Substratumsatzes auf Enzymebene anhand der Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD). Zum anderen wurde die mRNA-Expression für CYP2B1 bestimmt.

4.2.1 Bestimmung der PROD-Aktivität an Leberschnitthomogenat

Die PROD wird vor allem durch CYP2B1/2 vermittelt. Durch Depentylierung des Pentylresorufins unter Anwesenheit von Sauerstoff, NADPH, Glukose-6-Phosphat und MgCl_2 entsteht Resorufin, das aufgrund seiner guten Eigenschaft zur Fluoreszenz in sehr kleinen Konzentrationen nachweisbar ist und als Maß für den Substratumsatz dienen kann (Pohl & Fouts 1980).

Als Substrat diente in Methanol gelöstes Pentylresorufin (Stammlösung 50 nmol/ml). Hiervon wurden zur Doppelbestimmung jeweils 0,1 ml in zwei Zentrifugengläser mit Rundboden pipettiert. Das Methanol wurde im Wasserbad bei 90 bis 95°C verdampft. Damit wurde in dem Reaktionsansatz von 1 ml eine Substratkonzentration von 10 μM erreicht.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 ml Na-Phosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,44), 0,1 ml MgCl_2 (0,1 M), 0,1 ml Glukose-6-Phosphat (25 mM) und 0,1 ml der 1:30-Homogenat-Verdünnung. Nach kurzem Mischen mit dem Vortexer und 2 Minuten Vorinkubation im Wasserbad bei 37°C wurde die Reaktion mit 0,1 ml NADPH-Lösung (2,5 mM) gestartet.

Die Inkubation fand im Schüttelwasserbad (SW-21/SW-21D, SW-21C, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) bei 37°C statt. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eisgekühltem Methanol gestoppt. Anschließend wurden die Proben sofort in ein Eisbad gestellt und schließlich über 10 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert.

Die zu jedem Homogenat mitgeführten Leerwerte enthielten alle Reagenzien wie die Hauptwerte, jedoch fand keine Inkubation statt, und das NADPH wurde erst nach dem Methanol hinzugegeben.

Die anschließende Fluoreszenz-Messung wurde bei einer Wellenlänge von 540 / 585 nm (Exzitations- / Emissionswellenlänge) am Fluoreszenz-Spektralphotometer (Hitachi F-2000, Colora Messtechnik GmbH, Ratingen) durchgeführt. Vor jeder Messung wurde eine Eichkurve mit dem Metaboliten Resorufin erstellt. Der Substratumsatz wurde in [pmol Resorufin / min x mg Protein] angegeben.

4.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes als Bezugsgröße für die PROD

Es wurde die Biuret-Reaktion angewendet. Hierbei komplexieren in stark alkalischer Lösung mindestens zwei Peptidbindungsgruppen (CO-NH) ein Kupferkation, wodurch eine tief-violette Färbung verursacht wird. Von der Intensität der Färbung lässt sich durch photometrische Bestimmung der Extinktion auf die Menge von Peptiden und Proteinen schließen. Hier kam die für Lebergewebe optimierte Methode nach Klinger & Müller (1974) zum Einsatz.

Auf 0,15 ml Leberschnitthomogenat wurden 0,05 ml Na-Desoxycholat (10%ig) gegeben und nach 5 Minuten 0,8 ml Biuret-Lösung hinzugefügt. Die Messung der Extinktion erfolgte am Simultan-Spektralphotometer 1100 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) bei einer Wellenlänge von 546 nm und einer Küvettendicke von 1 cm an jeweils zwei Probenhauptwerten (Doppelbestimmung).

Des Weiteren wurde ein Trübungswert bestimmt und vom Probenhauptwert subtrahiert. Bei diesem Ansatz wurden 0,8 ml NaOH (3 %ig) anstelle der Biuret-Lösung hinzugefügt. Der Leerwert enthielt anstatt des Homogenats 0,15 ml Na-Phosphatpuffer (0,1 M) und wurde vor den Hauptwerten ermittelt.

Mit Rinderserumalbumin in 0,1 M Na-Phosphatpuffer wurde eine Eichkurve erstellt.

4.2.3 Bestimmung der CYP2B1-mRNA-Expression

4.2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Das Probenmaterial wurde nach der Inkubation sofort gewogen (max. 50 mg) und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei -80°C. Die zur Isolierung der RNA verwendeten Reagenzien entstammten dem InViSorb™ RNA Kit II (InViTek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin).

Unter Zugabe von 550 µl Lysis Solution wurde das Material mit einem Pistill im Eppendorf-Reaktionsgefäß homogenisiert und anschließend für 10 Minuten im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Es folgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 14500 U/min (Eppendorf Centrifuge 5403), sodass anschließend das am Grund befindliche Sediment vorsichtig mit einer Pipette angesaugt und entfernt werden konnte. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 30 µl Adsorbin zum Binden der genomischen DNA, kurzes Mischen mit dem Vortexer und weitere 5 Minuten Inkubation auf Eis.

Anschließend noch einmal 3 Minuten zentrifugiert, wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, ohne das pelletierte Adsorbin-Material mit aufzunehmen. Im nächsten Schritt wurden zu jeder Probe 500 µl Phenol, 50 µl Puffer A sowie 100 µl Chlorbrompropan hinzugegeben.

Dieser Ansatz wurde wiederum mit dem Vortexer gemischt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und 10 Minuten bei 14500 U/min zentrifugiert, um die obere, wässrige Phase mit der gelösten RNA in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß zu pipettieren. Nach Abschätzen des Volumens erfolgte eine Präzipitation der RNA durch Zugabe einer etwa gleichen Volumenmenge Isopropanol. Dieser Ansatz wurde weitere 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach anschließender 5minütiger Zentrifugation konnte man am Gefäßgrund ein weißliches RNA-Pellet erkennen. Dieses wurde soweit wie möglich mit einer Pipette vom Phenol befreit, anschließend mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und wieder 3 Minuten zentrifugiert. Zwei Wiederholungen dieses Waschvorganges waren nötig bis zur vollständigen Elimination des Phenols. Das restliche Ethanol verdampfte in den geöffneten Reaktionsgefäßen im Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) bei 60°C.

Die Resuspendierung der RNA-Pellets erfolgte mit 100 µl Nuklease-freiem Wasser. Nach Entnahme eines Aliquots zur Bestimmung der RNA-Konzentration (s. 3.2.3.2) wurden die Proben bis zur Durchführung der PCR bei -80°C gelagert.

4.2.3.2 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der isolierten Gesamt-RNA

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hingegen weisen Proteine, basierend auf aromatischen Aminosäureresten, ein Absorptionsmaximum bei 280 nm Wellenlänge auf.

Anhand der Bestimmung eines Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm kann der relative Anteil von RNA in der isolierten Fraktion ermittelt werden. Anwendung fanden Proben mit einem Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 (kleinere Quotienten deuteten auf Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin) (Schröder 1999).

Einer ausreichend genauen Quantifizierung des RNA-Gehaltes liegt zu Grunde, dass bei einem Lichtweg von 1 cm Küvettendicke ein Extinktionswert von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA entspricht (Manitas et al. 1989). Aus den am UV/VIS Spektrometer (UV 4-500 ATi UNICAM, UNICAM analytische Systeme GmbH, Kassel) gemessenen Absorptionswerten bei 260 nm wurde die Gesamt-RNA-Konzentration jeder Probe errechnet. Diese wurde später in die Berechnung der CYP2B1-mRNA-Konzentration einbezogen (Bezugsgröße).

4.2.3.3 Eich-RNA

Die Eich-RNA benötigte man zur Quantifizierung der Proben-CYP2B1-mRNA. Sie entsprach einem leicht modifizierten mRNA-Fragment für die Codierung von CYP2B1. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 309 Basenpaaren, während das PCR-Produkt des mRNA-Fragmentes von CYP2B1 eine Länge von 380 Basenpaaren aufwies. Aus der Stammlösung der Eich-RNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser eine Verdünnungsreihe hergestellt. Davon wurden später bei der kompetitiven RT-PCR Aliquots zu jedem Ansatz mit Proben-RNA zugesetzt (s. 3.2.3.4).

4.2.3.4 Kompetitive RT-PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. 1993 erhielt er hierfür den Nobelpreis für Chemie. Die Methode dient der enzymatischen Amplifizierung von DNA.

Dabei wird doppelsträngige DNA durch Erhitzen ($\geq 94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 bis 2 Minuten) denaturiert und in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Mittels einer thermostabilen Polymerase (Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bakterium) wird als nächstes zu jedem Einzelstrang ein Komplementärstrang erzeugt (Hybridisierung bei 50 bis 55°C, 1 bis 2 Minuten). Dazu bedarf es für jeden Strang eines komplementären Nukleinsäurefragments als Startpunkt (Primer). In der dritten Phase kommt es zur Extension der DNA (Polymerisation bei 72°C, 1 bis 2 Minuten). Mithilfe von spezifischen Primern und mehrfachem Wiederholen der zuvor genannten Schritte ist man in der Lage, bestimmte DNA-Fragmente beliebig zu amplifizieren.

Beim Amplifizieren von mRNA erfolgt zunächst die Umschreibung in eine komplementäre DNA (cDNA). Dies entspricht der gegenläufigen Richtung einer konventionellen Transkription und wird daher als reverse Transkription bezeichnet. Das hierzu notwendige Enzym ist die reverse Transkriptase (RT). Amplifizierung von RNA mittels PCR wird als RT-PCR bezeichnet.

Zur Bestimmung von CYP2B1-mRNA wurden folgende Primer in einer Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ verwendet:

CYP2B-rev: 5'-TTG GGA AGC AGG TAC CCT C-3'

CYP2B-fw: 5'-CCA AGC GCT CCA CGA GAC TT-3'

Das Prinzip der kompetitiven RT-PCR besteht darin, dass mehrere Aliquot-Ansätze jeder Proben-RNA mit verschiedenen Konzentrationen einer Eich-RNA-Verdünnungsreihe versetzt werden. In derjenigen Probe davon, in der die PCR-Produkte für das CYP2B1-Fragment des Lebergewebes und für die Eich-RNA in gleicher Konzentration vorliegen (sichtbar an gleich starken Banden bei der Gelelektrophorese), kann die CYP2B1-mRNA-Konzentration errechnet werden (s. 3.2.3.5).

Alle folgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden in einer Arbeitsbox mit UV-Beleuchtung (Laminarbox Holten LaminAir PCR MINI, Bioblock Scientific) durchgeführt, um das Risiko einer Kontamination der Proben mit Fremd-RNA zu reduzieren.

Während die zuvor bei -80°C gelagerten Proben in einem Eisbad auftauten, konnte der RT-Mastermix für die benötigte Menge hergestellt werden. Für jede Probe wurde dafür ein 8-lumiges Reaktionsgefäß (8er-Softstrip) bestückt. Das Gesamtvolumen des Mastermixes für eine Probe (für ein 8er-Strip) errechnete sich aus dem 8-fachen eines Einzelansatzes (für ein Tube) (**Tabelle 4.3**). Der Mastermix wurde zunächst für alle 8 Teilproben gemeinsam gemischt mit allen Komponenten außer der Eich-RNA.

Tabelle 4.3: RT-Mastermix (für eine Probe)

Komponente	einfacher Ansatz für ein Tube [µl]	Gesamtansatz (8-fach) für ein 8er-Strip [µl]
Nuklease-freies Wasser	4,05	32,4
RT-Puffer	1,0	8,0
MgCl ₂	2,0	16,0
DNTP	1,0	8,0
CYP2B-rw-Primer	0,5	4,0
RNA _{sin}	0,2 (8 U)	1,6 (64 U)
AMV-RTase	0,15 (3,6 U)	1,2 (28,8 U)
Proben-RNA	0,1	0,8
<i>später Eich-RNA-Zugabe</i>	<i>1,0</i>	<i>8 x 1,0</i>

Anschließend wurde der Submastermix auf ein 8er-Softstrip (9 µl/Reaktionseinheit) aufgeteilt, 1 µl verschiedener Eich-RNA-Verdünnungen hinzugegeben, die Gefäße verschlossen, in den Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) verbracht und dort für je 12 Minuten bei 42°C, 45°C und 48°C inkubiert.

Während dieser Zeit konnte der Mastermix für die PCR nach **Tabelle 4.4** vorbereitet werden. Die Berechnung der Volumina erfolgte dabei in der gleichen Weise wie für den RT-Mastermix.

Tabelle 4.4: PCR-Mastermix (für eine Probe)

Komponente	einfacher Ansatz für ein Tube [μ l]	Gesamtansatz (8-fach) für 1 8er-Strip [μ l]
Nuclease free Water	18,7	149,6
10x Taq Reaction Buffer with Mg^{2+}	2,5	20,0
dNTP Mix (10 mM)	0,5	4,0
CYP2B-FW-Primer (20 μ M)	1,0	8,0
CYP2B-REV-Primer (20 μ M)	1,0	8,0
Recombinant Taq DNA polymerase	0,3 (1,5 U)	2,4 (12 U)
<i>später RT-Produkt-Zugabe</i>	<i>1,0</i>	<i>8 x 1,0</i>

Auch der PCR-Mastermix wurde zunächst gemeinsam gemischt und erfuhr eine Aliquotierung auf 8er-Strips (24 μ l/Reaktionstube). Abschließend wurden jeweils 1 μ l des RT-Produktes mit der 8-Kanalpipette hinzugefügt. Es erfolgte die PCR im Thermocycler (Deckeltemperatur 103°C) bei folgendem Programm:

- 1 T = 94 °C, 3 min
- 2 T = 94 °C, 20 s
- 3 T = 55 °C, 20 s
- 4 T = 72 °C, 45 s
- 5 GO TO 2, REP 36
- 6 T = 72 °C, 1 min 30 s
- 7 HOLD

Der erste Zyklus startete bei Schritt 1 und endete bei Schritt 4. Jeder folgende Zyklus begann bei Schritt 2 und endete bei Schritt 4. Nach 36 Zyklen endete das Programm mit Schritt 6.

4.2.3.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA-Fragmente erfolgte mit einem Agarose-Gel in einer Elektrophoresekammer durch Anlegen einer elektrischen Spannung je nach Kammer von 100 bzw. 250 V (Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia Biotech).

Für das Gel wurden 2 g Agarose/100 ml DNA-Elektrophorese-Puffer (Laufpuffer/TBE-Puffer: auf 1 l Nuklease-freies Wasser: 5,385 g Tris , 2,76 g Borsäure, 0,372 g EDTA) in der Mikrowelle (Micromat 22 GK 21 EUA1, AEG) bei 1000 W zum Kochen gebracht, geschüttelt, wieder kurz aufgekocht und mit Ethidiumbromid (50 µl EB/100 ml Agarose-Puffer-Gemisch) versetzt.

Nach Abkühlen auf etwa 60°C kam das noch flüssige Gel in die Elektrophoresekammer, wo es nach Abkühlen gelierte und mit TBE-Puffer (s.o.) bedeckt wurde. Zur Bildung der Startkammern diente ein gezahnter, entfernbarer Kunststoffeinsatz.

10 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl 6-fach Beladungspuffer (50% Glycerin + 1 mM EDTA, 2-fach TBE-Puffer, Bromphenolblau, Xylencyanolkrümel (Front-, Folgemarker)) versetzt. Davon wurden 11 µl in eine Startkammer pipettiert.

Nach 45 Minuten erfolgte die Auswertung am UV-Lampenkasten (Helios Apparatebau, Jena). Anhand eines Elektrophorese-Kamera-Aufsatzes (EPH-6, Polaroid) und einer Kamera (Direct Screen Instant Camera DS 34, Polaroid) wurde das Ergebnis dokumentiert (**Abbildung 4.3**).

4.2.3.6 Auswertung der RT-PCR

Nach dem Prinzip der kompetitiven Amplifizierung von Proben-RNA und Eich-RNA zeigten sich die Elektrophorese-Banden je nach Ausgangskonzentration in unterschiedlicher Intensität. Lagen Proben-RNA und Eich-RNA in gleicher Ausgangskonzentration vor, wiesen ihre Banden in der Elektrophorese die gleiche Intensität auf. Anhand dieses so genannten Äquivalenzpunktes ließ sich von der bekannten Verdünnung der Eich-RNA (im Bild die obere Reihe der Banden) auf die Konzentration der CYP2B1- RNA rückschließen (**Abbildung 4.3**).

Die Angabe erfolgte als Anteil CYP2B1-RNA an der Gesamt-RNA [mol/µg Gesamt-RNA].

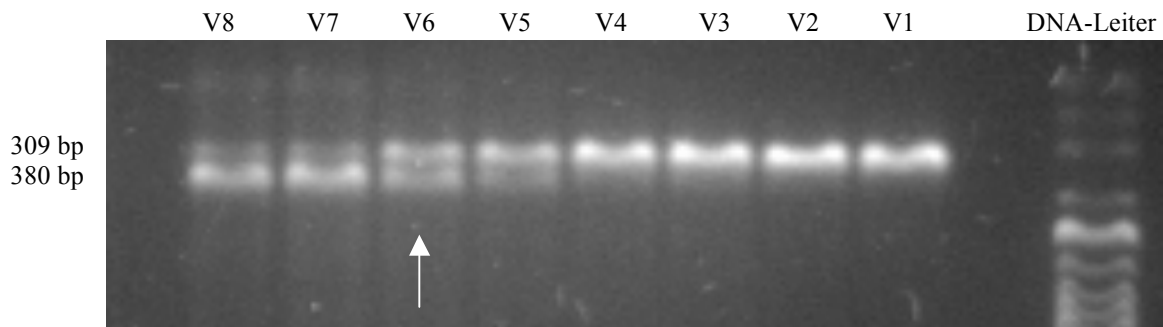


Abbildung 4.3: Gel-Elektrophorese einer kompetitiven RT-PCR. V1-V8: Verdünnungsstufen der Eich-RNA. Der Pfeil gibt den Äquivalenzpunkt an. Bei dieser Eich-RNA-Verdünnungsstufe lagen die RT-Produkte für Eich-RNA (309 bp) und CYP2B1-Fragment der Probe (380 bp) in annähernd gleicher Konzentration vor.

4.3 Statistik

Die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Schnittpräparationen (n = Anzahl der untersuchten Lebern) pro Inkubationszeit *in vitro* wurden als arithmetische Mittel \pm Standardfehler angegeben und als Diagramme dargestellt.

Zur Signifikanzprüfung diente der Student-t-Test für gepaarte Stichproben (zum Vergleich der Schnitte einer Leber) bzw. für unverbundene Stichproben (zum Vergleich zwischen Schnitten nach unterschiedlichen In-vivo-Vorbehandlungen der Lebern). Das dafür vorher festgelegte Signifikanzniveau betrug $\alpha \leq 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 CYP2B-Induktion in vitro in Leberschnitten unbehandelter Ratten

5.1.1 PROD-Aktivität

Im Homogenat von Leberschnitten unbehandelter Ratten zeigte die PROD eine geringe Aktivität, die während einer 24-stündigen Inkubation noch weiter abfiel (**Abbildung 5.1**). Durch Zugabe von PB zum Inkubationsmedium wurde nach 24 Stunden gegenüber den entsprechenden Kontrollschnitten ein signifikanter Induktionseffekt mit einem mittleren Faktor von 8 ausgelöst. Die Aktivität ließ sich auch gegenüber dem Ausgangsniveau (2h-Wert) signifikant auf das 4,5-fache steigern. Dabei zeigte sich eine relativ große interindividuelle Variabilität der In-vitro-Induzierbarkeit.

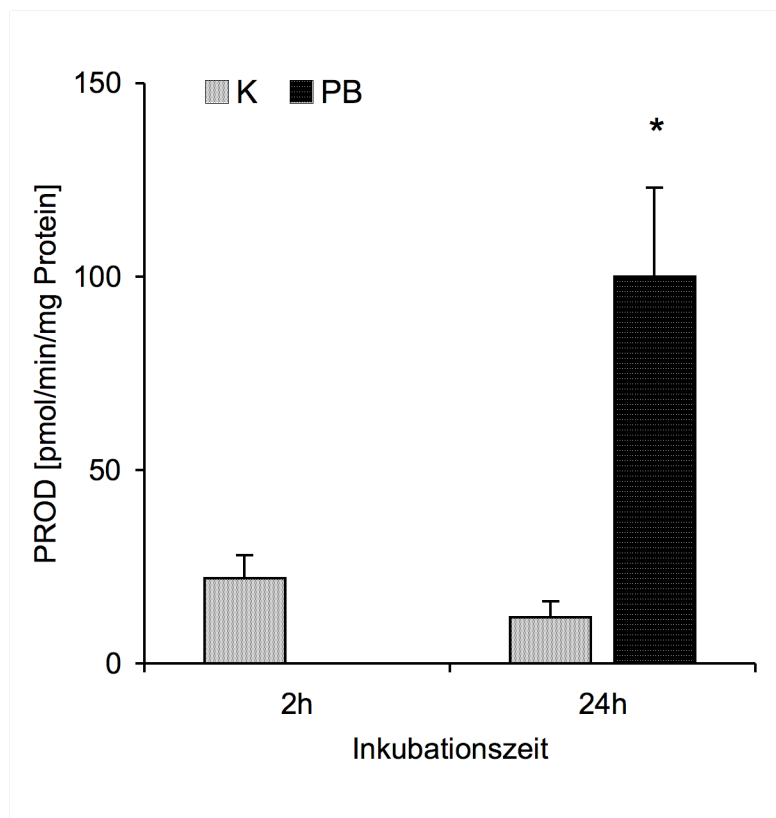


Abbildung 5.1

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten unbehandelter männlicher Wistar-Ratten nach einer 2- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardfehler fünf unabhängiger Schnittpräparationen (fünf Lebern). * = signifikanter Unterschied zwischen K- und PB-Schnitten nach der gleichen Inkubationsdauer (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

5.1.2 CYP2B1-mRNA-Expression

Bei der stichprobenartigen Bestimmung an den Proben eines Tieres zeigte sich eine geringe CYP2B1-Expression in Kontrollschnitten, die durch 24-stündige PB-Exposition fast 20-fach gegenüber den entsprechenden Kontrollschnitten gesteigert wurde. Die mRNA-Konzentration blieb bei den unbehandelten Schnitten über den beobachteten Zeitraum konstant (**Abbildung 5.2**).

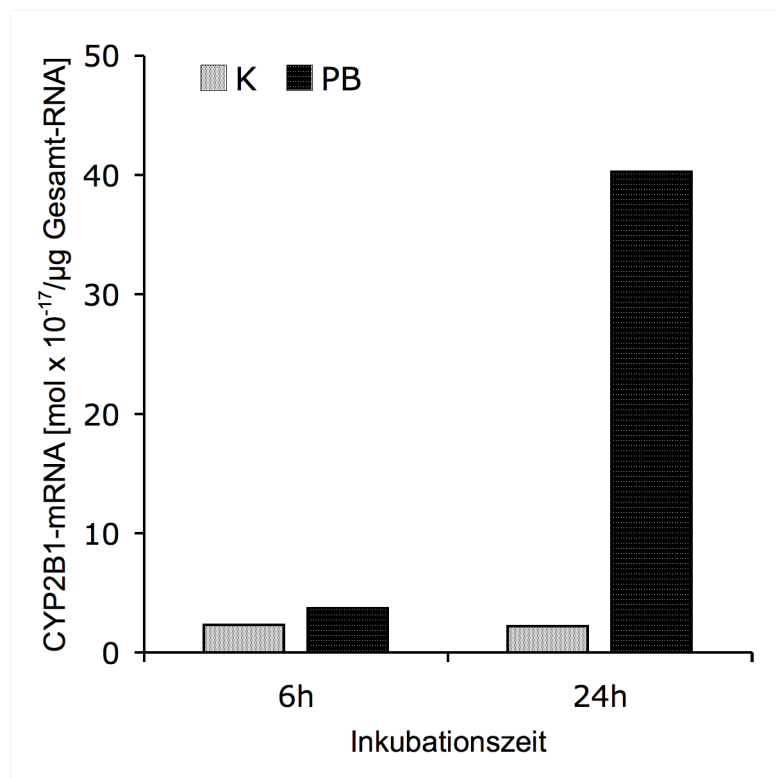


Abbildung 5.2

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten einer unbehandelten männlichen Wistar-Ratte nach einer 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte).

5.2 CYP2B-Induktion in vitro in Leberschnitten vorbehandelter Ratten

5.2.1 Leberentnahme 24h nach der letzten PB-Applikation in vivo

5.2.1.1 PROD-Aktivität

Im Leberschnittthomogenat dieser Versuchsserie mit PB-behandelten Ratten lag das Aktivitätsniveau der PROD zu Beginn (nach 2 Stunden Inkubation) ca. 20-fach höher als bei Schnitten unbehandelter Tiere (**Abbildung 5.3**, vgl. **Abbildung 5.1**). Während einer 6-stündigen Inkubation verminderte sich die PROD nur gering um etwa 10%. Eine weitere Inkubation, bis insgesamt 24 Stunden, führte zum Aktivitätsverlust um knapp 50%, wenn in vitro keine erneute PB-Exposition stattfand. Die Aktivität war damit noch um das 10-fache höher, als bei Schnitten unbehandelter Ratten.

Durch PB-Exposition der Schnitte für 2 oder 6 Stunden wurde die PROD nicht beeinflusst. Nach einer 24-stündigen Inkubation in PB-haltigem Medium deutete sich eine gewisse Aktivitätssteigerung gegenüber den entsprechenden Kontrollschnitten an. Der Anstieg um den mittleren Faktor 1,3 war jedoch nicht signifikant und um mehr als das 3-fache kleiner als bei der Verwendung von Schnitten unbehandelter Tiere (vgl. **Abbildung 5.1**).

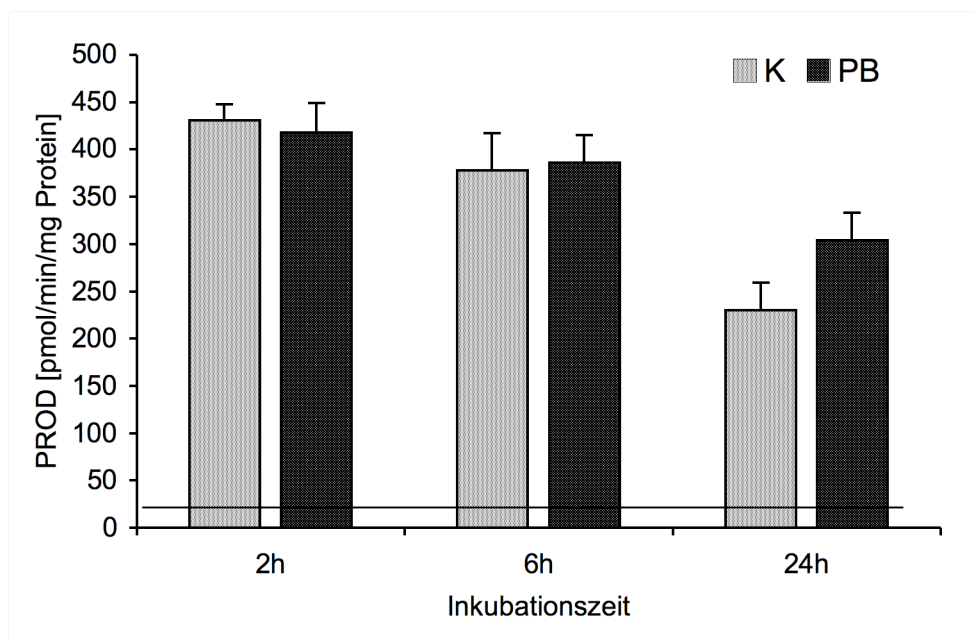


Abbildung 5.3

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten (3 x 60 mg/kg i.p.) nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten 24h nach der letzten PB-Gabe. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardfehler sechs unabhängiger Schnittpräparationen (sechs Lebern). Die horizontale Linie entspricht der PROD-Aktivität in Homogenat von Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 2-stündiger Inkubation.

5.2.1.2 CYP2B1-mRNA-Expression

Die Untersuchung wurde stichprobenartig an allen Gruppen eines Tieres durchgeführt. Vor der Inkubation der Leberschnitte (0h-Wert) war die CYP2B1-mRNA-Konzentration sehr hoch (**Abbildung 5.4**). Mit Beginn der Inkubation setzte ein kontinuierlicher Abfall ein, der sich über 24 Stunden fortsetzte, sodass zum Schluss nur noch ca. 14% des Ausgangswertes vorhanden waren.

Durch PB-Zugabe in vitro war nach 6 Stunden Inkubation bereits ein Anstieg der mRNA-Expression um annähernd das Doppelte, verglichen mit den jeweiligen Kontrollschnitten, zu verzeichnen. Dabei wurde das Ausgangsniveau (0h-Wert) noch nicht überschritten. Dies war dann nach 24 Stunden PB-Exposition der Fall. Die PB-Schnitte wiesen nun eine CYP2B1-mRNA-Expression auf, die 15-mal so hoch wie die der entsprechenden Kontrollschnitte war. Dies entsprach dem Zweifachen des Ausgangsniveaus.

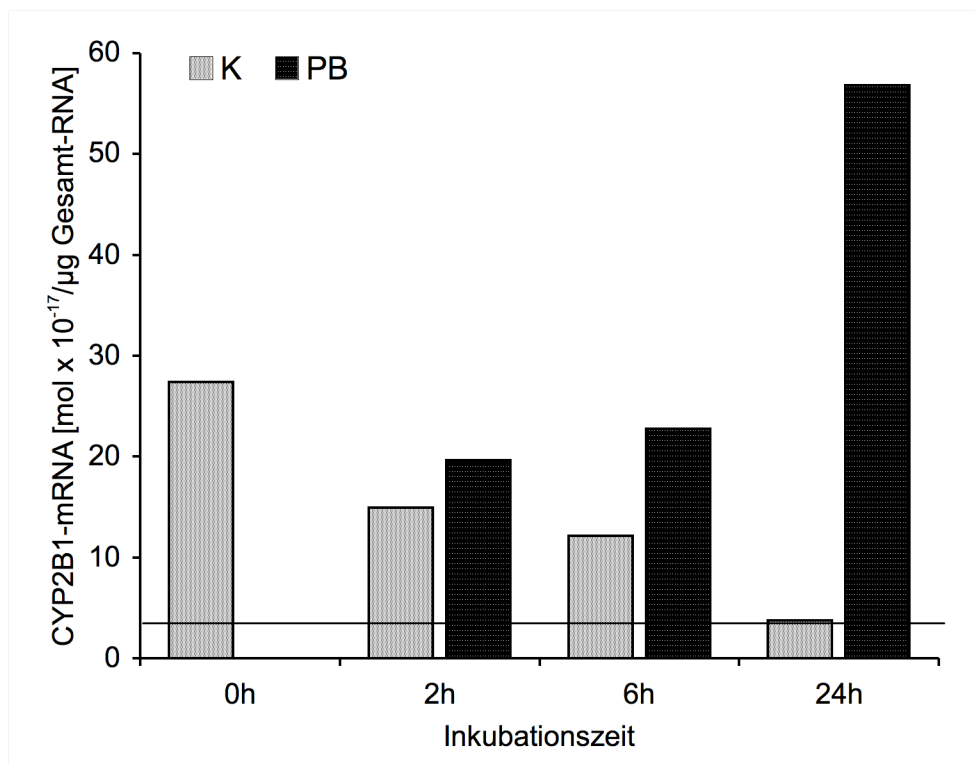


Abbildung 5.4

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten einer PB-behandelten männlichen Wistar-Ratte (3 x 60 mg/kg i.p.) nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten 24h nach der letzten PB-Gabe. Die horizontale Linie entspricht der CYP2B1-mRNA-Konzentration von Leberschnitten einer unbehandelten Ratte nach 6-stündiger Inkubation.

5.2.2 Leberentnahme 48h nach der letzten PB-Applikation in vivo

5.2.2.1 PROD-Aktivität

Das Ausgangsniveau der PROD entsprach weitgehend dem der zuvor beschriebenen Versuchsserie (**Abbildung 5.5**, vgl. **5.2.1.1**). Gleiches trifft für die PROD-Aktivitäten nach 6 und 24 Stunden Inkubation der Leberschnitte und für das Induktionsmuster zu. Die Aktivitäten waren während der 6-stündigen Inkubation um etwa 20%, nach 24 Stunden um etwas mehr als 50% abgefallen. Der hier innerhalb von 24 Stunden erzielte Induktionseffekt durch PB in vitro gegenüber den entsprechenden Kontrollschnitten war zwar gering (mittlerer Induktionsfaktor von 1,4), erwies sich aber als signifikant. In allen Gruppen waren die Aktivitäten deutlich höher als in den Schnitthomogenaten unbehandelter Tiere (vgl. **5.1.1**).

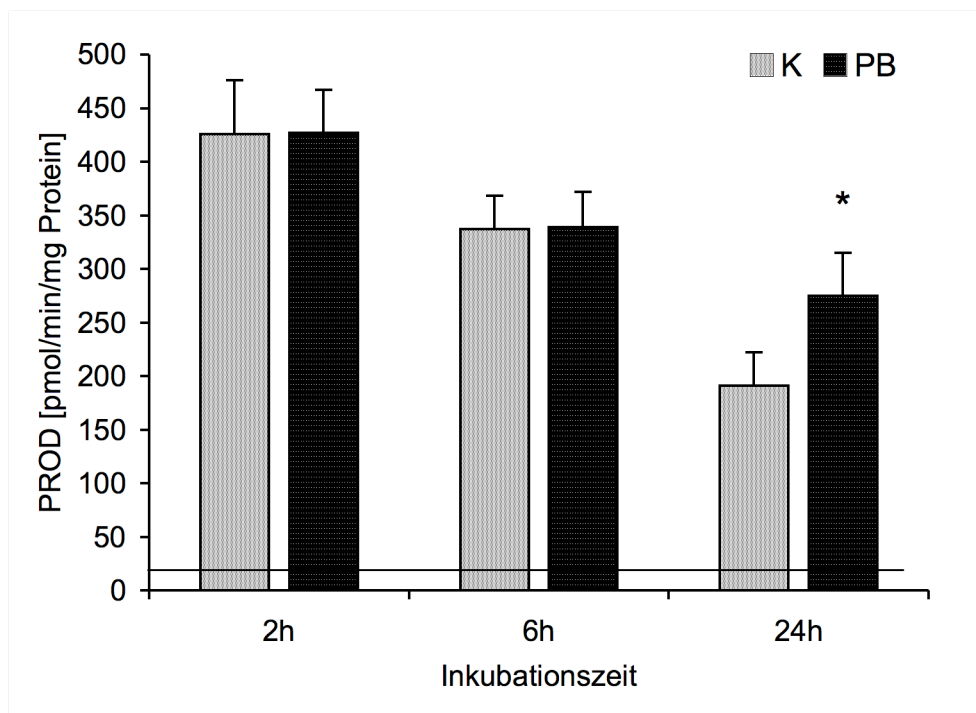


Abbildung 5.5

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten (3 x 60 mg/kg i.p.) nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten 48h nach der letzten PB-Gabe. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardfehler sechs unabhängiger Schnittpräparationen (sechs Lebern). Die horizontale Linie entspricht der PROD-Aktivität in Homogenat von Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 2-stündiger Inkubation. * = signifikanter Unterschied zwischen K- und PB-Schnitten nach der gleichen Inkubationsdauer (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

5.2.2.2 CYP2B1-mRNA-Expression

In dieser Serie wurde ebenfalls eine stichprobenartige Bestimmung aller Gruppen eines Tieres vorgenommen. Das Ausgangsniveau der CYP2B1-mRNA-Expression (0h-Wert) war inzwischen achtmal niedriger als in den entsprechenden Schnitten, die schon 24 Stunden nach der letzten PB-Gabe gewonnen worden waren (**Abbildung 5.6**, vgl. 5.2.1.2). Durch Inkubation der Schnitte in PB-haltigem Medium wurde ein zeitabhängiger Induktionseffekt erzielt, der nach 6 Stunden bereits das 2,6-fache und nach 24 Stunden etwa das 11-fache im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollschnitten erreichte. Damit war das Ausgangsniveau um das 8-fache überschritten.

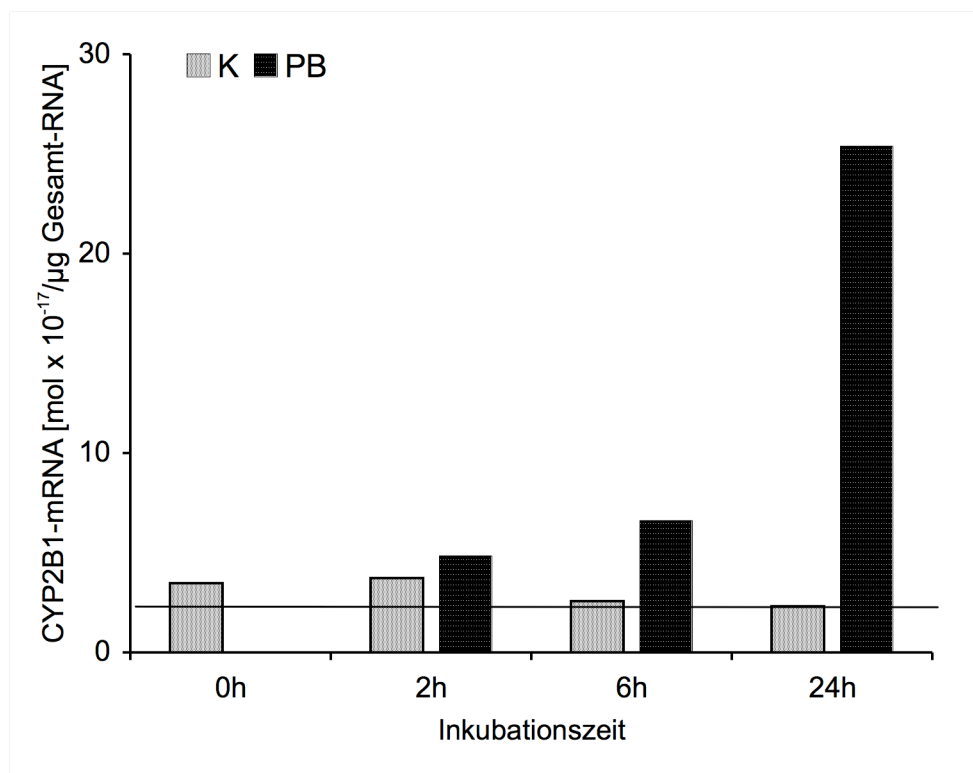


Abbildung 5.6

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten einer PB-behandelten männlichen Wistar-Ratte (3 x 60 mg/kg i.p.) nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten 48h nach der letzten PB-Gabe. Die horizontale Linie entspricht der CYP2B1-mRNA-Konzentration von Leberschnitten einer unbehandelten Ratte nach 6-stündiger Inkubation.

5.2.3 Leberentnahme 72h nach der letzten PB-Applikation in vivo

Drei Tage nach der letzten PB-Injektion in vivo war die PROD-Aktivität der frisch präparierten Leberschnitte (nach 2 Stunden Inkubation) etwa 35% geringer als bei den beiden zuvor beschriebenen Versuchsserien mit Leberschnitten PB-behandelter Tiere (**Abbildung 5.7**, vgl. **5.2.1.1** und **5.2.2.1**), aber immer noch um das 10-fache höher als in Leberschnitten unbehandelter Ratten (vgl. **5.1.1**). Der relative Abfall der Aktivitäten während der 24-stündigen Inkubation in den Kontrollschnitten verlief ähnlich wie in den anderen Serien (um etwa 15% in 6 Stunden und 55% in 24 Stunden). Wiederum zeichnete sich ein Induktionseffekt gegenüber den Kontrollschnitten erst nach 24-stündiger PB-Exposition in vitro ab (Induktionsfaktor 1,9), der auch signifikant war.

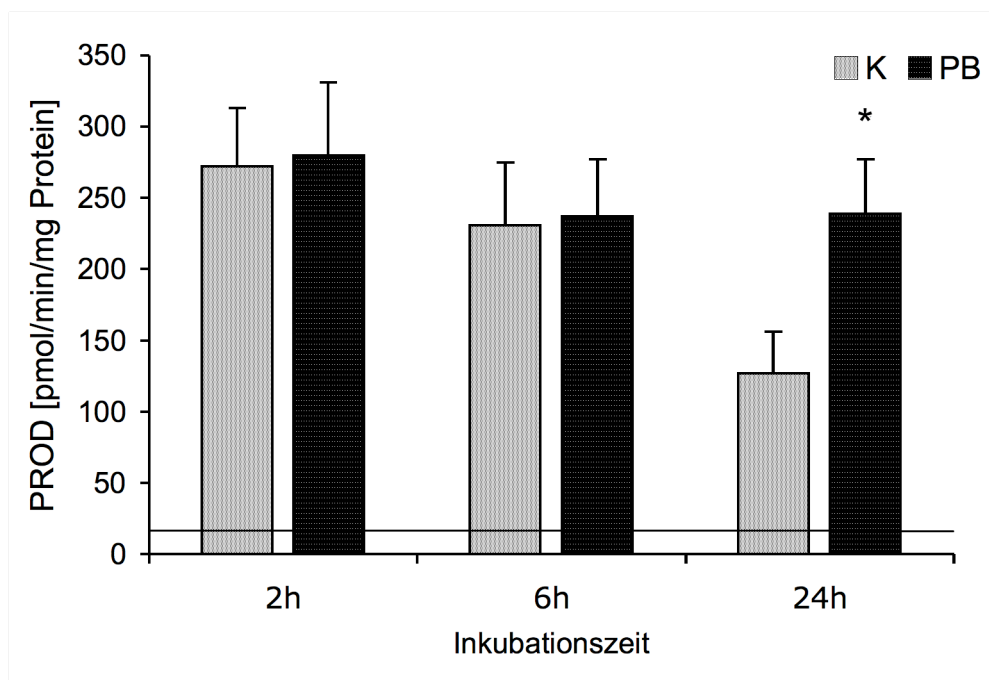


Abbildung 5.7

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten (3 x 60 mg/kg i.p.) nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten 72h nach der letzten PB-Gabe. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardfehler sechs unabhängiger Schnittpräparationen (sechs Lebern). Die horizontale Linie entspricht der PROD-Aktivität in Homogenat von Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 2-stündiger Inkubation. * = signifikanter Unterschied zwischen K- und PB-Schnitten nach der gleichen Inkubationsdauer (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

Auf eine Bestimmung der CYP2B-mRNA-Expression wurde in dieser Versuchsserie verzichtet, weil bereits 48 Stunden nach der letzten PB-Applikation das Ausgangsniveau sehr niedrig war und der mRNA-Gehalt sich während der Inkubation auch kaum weiter vermindert hatte. Eine längere Pausierung nach der In-vivo-Behandlung mit PB ließ keine Änderung im Induktionsmuster im Vergleich zu Schnitten unbehandelter Tiere erwarten.

5.2.4 Leberentnahme 4 Tage und länger nach der letzten PB-Applikation in vivo

Da die PROD-Aktivitäten 72 Stunden nach der letzten PB-Gabe immer noch sehr hoch waren, wurden einige zusätzliche Versuche mit geringerem Stichprobenumfang ($n = 3$ bis 4) durchgeführt, um den weiteren Verlauf beim Abklingen der In-vivo-Induktion des Spendergewebes zu verfolgen.

Bis zu einem Zeitraum von sechs Tagen nach der letzten PB-Behandlung in vivo ließ sich bei den Leberschnitten weiterhin der Trend einer Abnahme der PROD-Aktivität feststellen. Das niedrige Niveau von entsprechenden Schnitten unbehandelter Tiere wurde jedoch noch nicht ganz erreicht (**Abbildung 5.8**). Wie bei den zuvor beschriebenen Serien, war auch bei den Kontrollschnitten dieser Gruppen während des 24-stündigen Inkubationszeitraumes ein Aktivitätsverlust von annähernd 60% zum entsprechenden Ausgangsniveau zu beobachten.

Nach 4 Tagen Latenz zwischen der letzten PB-Gabe in vivo und Schnittpräparation führte die PB-Exposition in vitro nahezu zu einer Verdopplung der PROD gegenüber den jeweiligen Kontrollschnitten (Induktionsfaktor 1,8). Das Ausgangsniveau wurde damit zwar noch nicht überschritten, jedoch annähernd erreicht. Erst bei den Versuchsgruppen mit 5 oder 6 Tagen Latenz ließ sich die PROD-Aktivität durch eine 24-stündige Inkubation mit PB über das entsprechende Ausgangsniveau (2h-Werte) hinaus induzieren. Die PROD-Aktivitätssteigerung gegenüber den jeweiligen Kontrollschnitten (24h-Werte) auf etwa das 5-fache war jedoch aufgrund des geringen Stichprobenumfanges nicht signifikant (**Abbildung 5.8**).

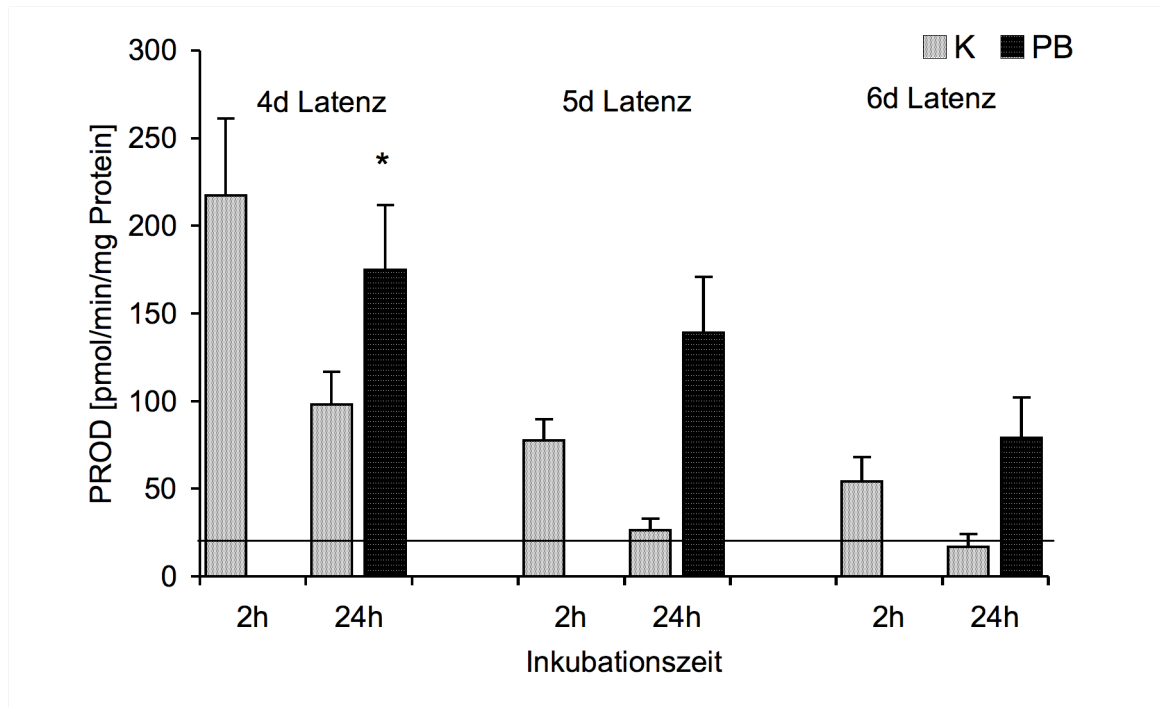


Abbildung 5.8

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten (3 x 60 mg/kg i.p.) nach einer 2- oder 24-stündigen Inkubation ohne (K-Schnitte) oder mit PB-Exposition *in vitro* (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten mit einer Latenz von 4 (n = 4), 5 (n = 3) oder 6 (n = 3) Tagen nach der letzten PB-Gabe. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardfehler. Die horizontale Linie entspricht der PROD-Aktivität in Homogenat von Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 2-stündiger Inkubation. * = signifikanter Unterschied zwischen K- und PB-Schnitten der gleichen Inkubationsdauer (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

5.3 Vergleich der Versuchsserien

In diesem Abschnitt werden die schon gezeigten Ergebnisse der verschiedenen Versuchsserien nochmals gegenübergestellt, um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede besser sichtbar zu machen.

5.3.1 Vergleich der PROD-Aktivitäten

Zur Charakterisierung der Ausgangslage nach PB *in vivo* wurden die 2h-Werte von Kontrollschnitten aller Serien herangezogen.

Aus **Abbildung 5.9** wird ersichtlich, dass in Leberschnitten vorbehandelter Tiere ein und zwei Tage nach der letzten Vorbehandlung von Anfang an eine starke, etwa 20-fach höhere PROD-Aktivität im Vergleich zu Leberschnitten unbehandelter Ratten bestand. Mit zunehmender Latenz zwischen Vorbehandlung und Schnittpräparation nahm diese *in vivo* induzierte Aktivität schrittweise ab. Sechs Tage nach der letzten PB-Injektion *in vivo* war die PROD gegenüber der unbehandelten Ratten jedoch noch immer leicht erhöht.

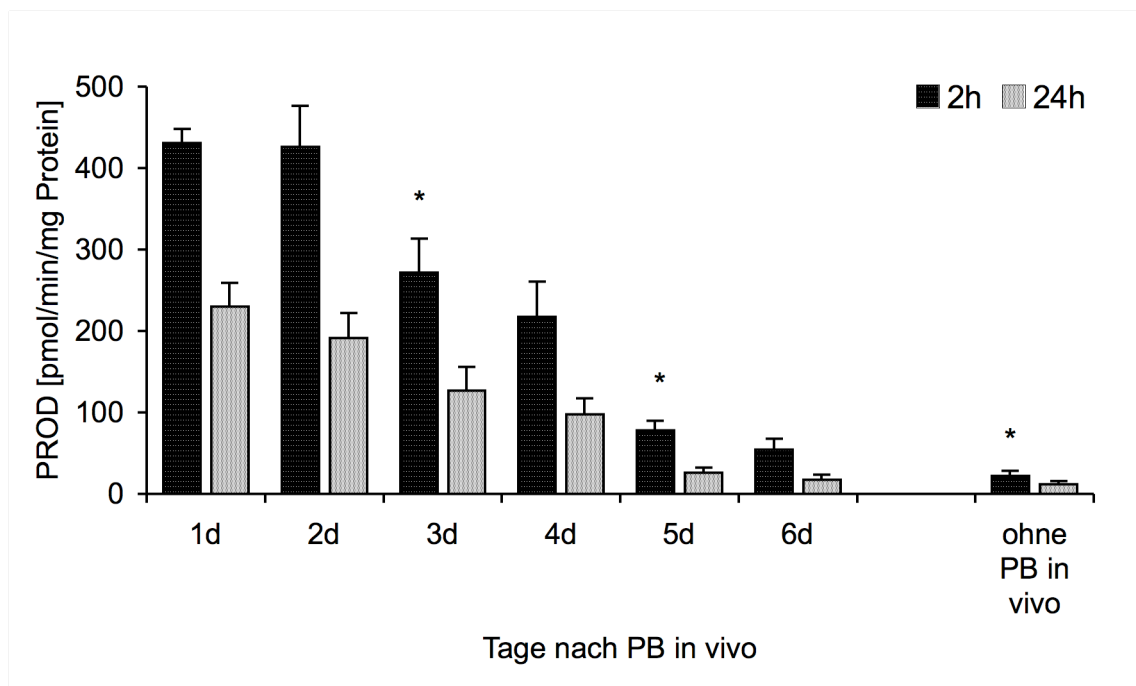


Abbildung 5.9

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten ($3 \times 60 \text{ mg / kg KG}$, i.p.) nach 2- und 24-stündiger Inkubation ohne PB *in vitro*. Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten mit unterschiedlicher Latenz zur letzten PB-Gabe (Tage nach PB *in vivo*). Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardfehler unabhängiger Schnittpräparationen. * = Signifikanter Unterschied zur jeweils links dargestellten Gruppe (t-Test für unverbundene Stichproben, $p \leq 0,05$).

Bei den untersuchten Gruppen reduzierte sich die PROD-Aktivität *in vitro* innerhalb von 24 Stunden in etwa auf die Hälfte des Ausgangswertes, wenn kein PB ins Inkubationsmedium gegeben wurde. Dieser Verlauf war unabhängig davon, wie lange die Tiere nach der letzten PB-Injektion *in vivo* noch lebten, also unabhängig vom jeweiligen Ausgangsniveau. Die *in vivo* induzierte Aktivität dagegen ging erst nach einer PB-Latenz von etwa 4 Tagen auf die Hälfte des Ausgangswertes zurück (**Abbildung 5.9**).

Die In-vitro-Induzierbarkeit der PROD durch PB war abhängig vom Ausgangsniveau. Bei größerer Latenz zwischen Vorbehandlung und Schnittpräparation konnten größere Induktionsfaktoren beobachtet werden. Der größte Faktor zeigte sich bei Leberschnitten unbehandelter Tiere. Allerdings betrug hier der Absolutwert der gemessenen Aktivität nur etwa ein Drittel des Wertes, der bei In-vitro-Induktion mit einem Tag Latenz nach PB in vivo gemessen wurde (**Abbildung 5.10**).

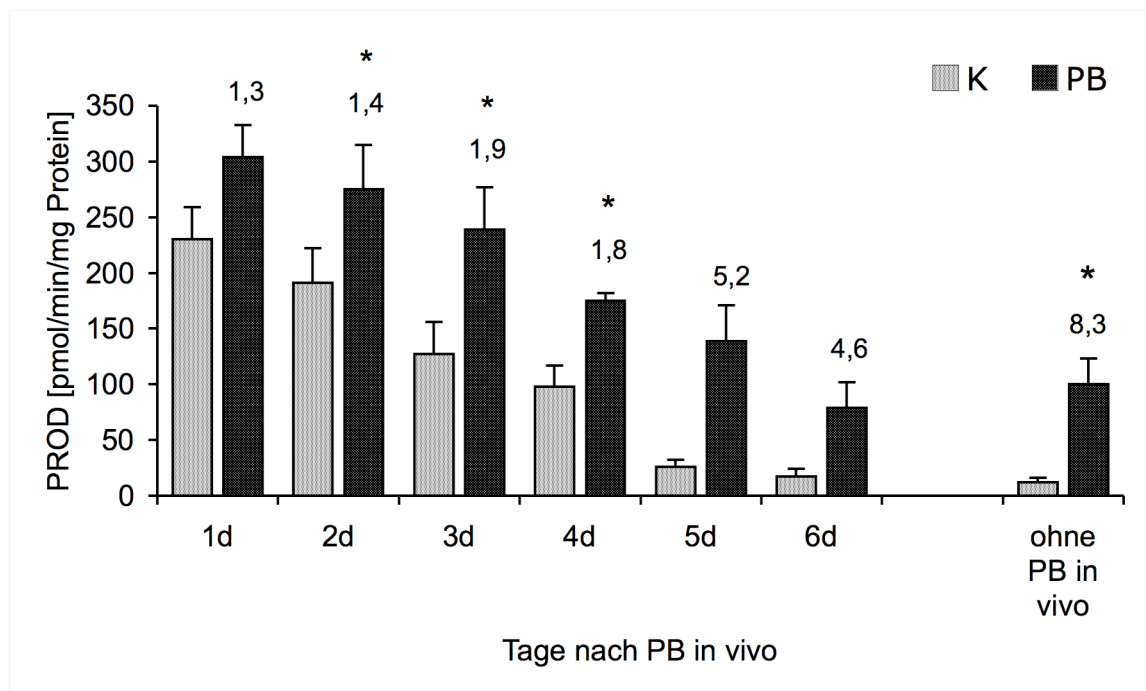


Abbildung 5.10

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten (3x 60mg / kg KG, i.p.) nach 24-stündiger Inkubation ohne (K-Schnitte) und mit PB in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten mit unterschiedlicher Latenz zur letzten PB-Gabe (Tage nach PB in vivo). Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardfehler unabhängiger Schnittpräparationen. Die Zahlen über den Säulen geben die mittleren Induktionsfaktoren gegenüber den Kontrollschnitten an. * = signifikante Induktion gegenüber den jeweiligen Kontrollschnitten (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

5.3.2 Vergleich der CYP2B1-mRNA-Konzentrationen

Zur Charakterisierung der Ausgangskonzentrationen von CYP2B1-mRNA nach PB-Behandlung *in vivo* wurden die 0h-Werte herangezogen. Bei den Schnitten der unbehandelten Ratte diente hierzu der 6h-Wert.

In Leberschnitten vorbehandelter Tiere war die CYP2B1-mRNA-Expression einen Tag nach der letzten Vorbehandlung im Vergleich zu Leberschnitten unbehandelter Ratten etwa 12-fach erhöht. Bereits nach einem weiteren Tag Latenz nach PB *in vivo* entsprach die Expression in etwa der unbehandelten Ratten. Dabei war die Abklinggeschwindigkeit der mRNA-Expression *in vitro* etwa gleich der *in vivo* (**Abbildung 5.11**).

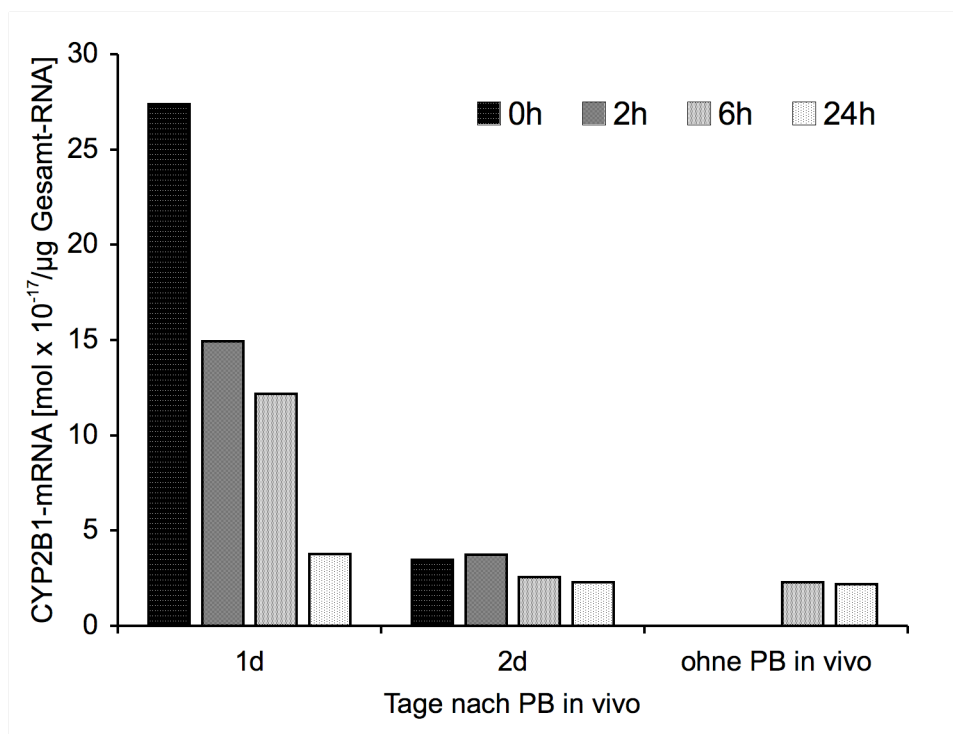


Abbildung 5.11

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten (3x 60mg / kg KG, i.p.) nach 0-, 2-, 6- und 24-stündiger Inkubation ohne PB *in vitro*. Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten mit unterschiedlicher Latenz zur letzten PB-Gabe (Tage nach PB *in vivo*). Dargestellt sind die Stichproben von je einem Tier.

Die In-vitro-Induzierbarkeit der CYP2B1-mRNA-Expression durch PB lag bei allen Gruppen in ähnlicher Größenordnung, also weitgehend unabhängig vom Ausgangsniveau. Dies galt sowohl für die Induktionsfaktoren, als auch für die Absolutwerte (**Abbildung 5.12**).

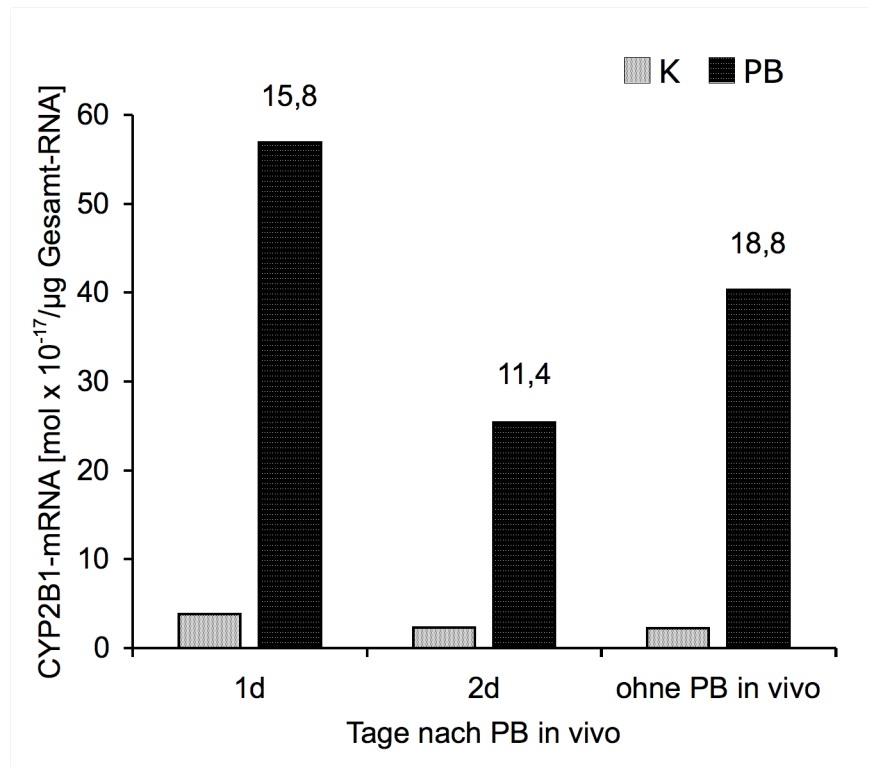


Abbildung 5.12

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter männlicher Wistar-Ratten (3x 60mg / kg KG, i.p.) nach 24-stündiger Inkubation ohne (K-Schnitte) und mit PB in vitro (10^{-4} M, PB-Schnitte). Leberentnahme und Schnittpräparation erfolgten mit unterschiedlicher Latenz zur letzten PB-Gabe (Tage nach PB in vivo). Die Zahlen über den Säulen geben die Induktionsfaktoren gegenüber den Kontrollschnitten an. Dargestellt sind die Stichproben von je einem Tier.

6 Diskussion

Bisher gibt es kaum Untersuchungen, die sich mit In-vitro-Induzierbarkeit nach In-vivo-Induktion beschäftigen. Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen besteht darin, in vitro die CYP2B-Induzierbarkeit von Lebergewebe (hier am In-vitro-Modell Präzisionsleberschnitt) zu belegen, das in vivo bereits durch PB vorinduziert worden war. Es zeigte sich, dass CYP2B in solchem Gewebe prinzipiell in vitro wiederinduzierbar ist, was aber nur auf mRNA-Ebene uneingeschränkt nachgewiesen werden kann. Auf Enzymaktivitätsebene hängt die Nachweisbarkeit stattdessen stark vom Ausgangsniveau der CYP2B-abhängigen Modellreaktion ab, und eine Wiederinduzierbarkeit wird erst sichtbar, wenn der In-vivo-Effekt (hier die PROD-Aktivität) ausreichend abgeklungen ist. Dieser Befund unterscheidet sich von Ergebnissen, die mit anderen Induktortypen erhoben wurden.

Somit lässt sich insgesamt feststellen, dass Ausmaß und Abklinggeschwindigkeit der CYP2B-Induktion durch PB in vivo einen entscheidenden Einfluss auf die nachfolgende Induzierbarkeit in vitro zu haben scheinen. Die Induktionsfaktoren waren vor allem auf Aktivitätsebene umso größer, je geringer die Ausgangsaktivität war. Im Folgenden soll auf die einzelnen Befunde näher eingegangen werden.

6.1 Einfluss von PB in vivo auf die CYP2B-Expression in den Leberschnitten

Zunächst stellte sich die Frage, ob sich eine Vorbehandlung mit PB in vivo noch in Leberschnitten, die von diesen Spendertieren gewonnen wurden, nachweisen lässt. Aus der Literatur ist bekannt, dass PB in vivo neben vielfältigen anderen Effekten die sehr niedrige CYP2B-Basalaktivität der Rattenleber deutlich induzieren kann. Es wurden dabei je nach Nachweismethode Induktionsfaktoren von 10 bis 100 beobachtet (Parkinson 1996, Shinohara et al. 1997, Waxman & Azaroff 1992). Maximale Induktionseffekte wurden in der Regel 24 oder auch noch 48 Stunden nach einer 3 bis 4-tägigen Vorbehandlung erzielt. In früheren Arbeiten des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie Jena war dadurch die PROD in 9000g-Überstand der Rattenleber etwa 16- bis 20-fach erhöht worden (Müller 1990; Mentzel & Patzer 1990). Die gesteigerte Monooxygenase-Aktivität ist überwiegend auf eine Proteinneosynthese durch Erhöhung der Transkription zurückzuführen. Zusätzlich

werden posttranskriptionelle Regulationsmechanismen sowie mRNA- und Proteinstabilisierung diskutiert (Parkinson 1996, Waxman & Azaroff 1992). Sehr häufig wurde die In-vivo-Induktion auf Aktivitätsebene an Lebermikrosomen oder 9000g-Überstand ex vivo bestimmt. Auch eine Steigerung des CYP2B-Gehaltes wurde nachgewiesen. Sie betrug z.B. bei Phillips et al. (1983) das 43-fache unbehandelter Lebern. In isolierten Hepatozyten PB-vorbehandelter Ratten war der CYP2B-Gehalt gegenüber Zellen unbehandelter Tiere etwa 7-fach erhöht (Saad et al. 1993).

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte nun gezeigt werden, dass auch in Leberschnitten ein vorausgegangener In-vivo-Effekt von PB nachweisbar ist. Von denjenigen Tieren, die 24 Stunden nach Ende der PB-Verabreichung getötet wurden (maximaler Induktionseffekt), war die PROD kurz nach der Schnittpräparation (2-Stunden-Werte) ca. 20-fach höher als in Leberschnitten unbehandelter Tiere. Somit liegt dieser In-vivo-Effekt von PB im gleichen Bereich wie in anderem Ex-vivo-Material. Dies ist nicht überraschend, da der Erhalt von durch PB erhöhtem CYP2B über einige Stunden entsprechend seiner Halbwertszeit (etwa 20 Stunden nach Sadano & Omura 1983) zu erwarten war. Die Aufrechterhaltung von unterschiedlichen differenzierten Enzymen einschließlich CYP in Leberschnitten ohne Störung durch die Schnittpräparation ist mehrfach gezeigt worden (Lerche-Langrand & Toutain 2000) und spiegelte sich auch in den eigenen Versuchen in hohen absoluten PROD-Aktivitäten nach PB-Exposition wider. Dies steht im Gegensatz zu relativ niedrigen Enzymaktivitäten (verschiedene CYP betreffend) in isolierten Leberzellen schon kurz nach der Isolationsprozedur (Binda et al. 2003).

Auch auf mRNA-Ebene blieb der PB-Effekt der In-vivo-Vorbehandlung erwartungsgemäß erhalten. In frisch präparierten Leberschnitten 24 Stunden nach der letzten PB-Gabe fand sich eine 12-fach höhere CYP2B1-mRNA-Expression im Vergleich zur sehr niedrigen basalen Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten (vgl. **Abbildung 5.4** und **Abbildung 5.2**, s.a. **Abbildung 5.11**). Dieser Induktionsfaktor liegt somit etwa in der gleichen Größenordnung wie für die PROD. In der Literatur finden sich mitunter sehr unterschiedliche Induktionsfaktoren für CYP2B1-mRNA durch PB in vivo bei der Ratte. Mittels Hybridisierungstechnik mit einer DNA-Sonde fanden Adesnik et al. (1981) eine 30-fache Erhöhung der spezifischen zytosolischen CYP2B-mRNA durch einmalige PB-Vorbehandlung, die 20 Stunden nach der Injektion maximal ausgeprägt war und dann wieder abfiel. Dieser Maximalspiegel wurde auch nach 2, 3 oder 4 PB-Injektionen nicht über-, sondern eher leicht unterschritten. Auch bei Agrawal & Shapiro (2003) war das Ausmaß der Induktion durch PB auf allen Ebenen in den ersten drei Behandlungstagen

höher als in den drei folgenden Behandlungstagen. Somit ist davon auszugehen, dass die CYP2B1-mRNA-Induktion unabhängig von der Anzahl der Injektionen innerhalb des ersten Tages der Behandlung abläuft und bei weiteren Behandlungen lediglich aufrechterhalten wird. Eine zunehmende Erhöhung der CYP-Menge ist trotzdem über posttranskriptionelle Mechanismen denkbar. Pustyl'nyak et al. (2005) beschrieben lediglich eine Verdopplung der CYP2B1/2-mRNA. Andererseits fanden Baldwin et al. (2006) und Martignoni et al. (2004) Faktoren, die um 2 oder sogar 3 Größenordnungen höher lagen als in den eigenen Versuchen. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Ergebnisse der letztgenannten Autoren mit Hilfe der Real-time-PCR gewonnen wurden. Dabei wird ein relativer Induktionsfaktor zur jeweiligen Ausgangskonzentration bestimmt. Die absoluten RNA-Konzentrationen werden nicht ermittelt. Bei der bekanntermaßen sehr niedrigen Basalexpression der hepatischen CYP2B1-mRNA können kleine absolute Konzentrationen zu sehr großen Induktionsfaktoren führen, die sich bei nur geringgradigen Unterschieden zwischen einzelnen Kontrolltieren leicht vervielfachen. Gewisse interindividuelle Unterschiede der absoluten CYP2B1-mRNA-Konzentration, sowohl basal als auch nach PB in vivo, sind durchaus zu erwarten, wie es in weiteren Versuchen im hiesigen Institut unter gleichen Bedingungen wie bei der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde (Stahmann 2003). Gleichwohl ist die CYP2B1-mRNA-Induktion durch PB in vivo in jedem Fall sicher nachweisbar und auch in Leberschnitten kurz nach der Präparation vorhanden.

Es war nun von Interesse festzustellen, wie lange nach Ende der PB-Vorbehandlung eine In-vivo-Induktion im Lebergewebe und damit vermutlich auch in den Leberschnitten weiter besteht und geplante In-vitro-Untersuchungen beeinflussen könnte. Solche Kenntnisse könnten die Beurteilung von Spendergewebeeigenschaften nach Absetzen von PB oder ähnlichen Substanzen erleichtern. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das langsame Abklingen der induzierten CYP2B-Aktivität in vivo über einige Tage auch an den Leberschnitten sichtbar wird.

Die PROD der Leberschnitte (2-Stunden-Werte) blieb über einen Zeitraum von 48 Stunden nach der letzten PB-Behandlung in vivo stabil erhöht und war dann sehr langsam rückläufig. Selbst nach sechs Tagen Latenz zwischen Ende der PB-Behandlung und Schnittpräparation war das Niveau unbehandelter Ratten noch nicht ganz erreicht (s. **Abbildung 5.8** und **Abbildung 5.9**). Bei anderen Modellinduktoren wie Dexamethason oder BNF verlief der Rückgang der in vivo induzierten CYP-Aktivitäten deutlich schneller innerhalb von 1 bis 2 Tagen (Glöckner et al. 2001; Lieder 2007). Die anfängliche Stabilität

der PB-Induktion lässt sich zumindest teilweise durch die Pharmakokinetik des Induktors erklären. Mit der dreimaligen Verabreichung von 60 mg/kg PB findet eine Kumulation statt, da die PB-Halbwertszeit von 10 bis 24 Stunden bei Ratten relativ lang ist, sodass die Induktionswirkung zunächst aufrecht erhalten bleibt (Brouwer et al. 1984). Auch viel niedrigere PB-Dosierungen reichen aus, um eine CYP2B-Induktion auszulösen (z.B. 3 bis 6 x 10 mg/kg bei Agrawal & Shapiro 2003). Dementsprechend ist bei der von uns verabreichten Dosierung frühestens 3 Tage nach der letzten Gabe oder noch später ein Abfall der PB-Konzentration in vivo unter induzierende Spiegel zu erwarten. Erst nach dem Nachlassen der PB-Wirkung dürfte der Rückgang der induzierten PROD-Aktivität wahrscheinlich vorwiegend durch die Halbwertszeit von CYP2B bedingt sein, welche bei vorbehandelten Ratten etwa 20 Stunden beträgt (Sadano & Omura 1983). Dies scheint in den eigenen Versuchen tatsächlich erst nach dem vierten Tag ab Ende der Vorbehandlung der Fall zu sein, da in den 2-Stunden-Werten der PROD-Abfall erst am fünften Tag mehr als 50% im Vergleich zum Vortag betrug (s. **Abbildung 5.9**). Das langsame Abklingen einer in vivo durch PB oder ähnliche Barbiturate erzeugten Induktion der CYP2B-Aktivität bei Ratten oder Mäusen ist in früheren Arbeiten bereits dokumentiert (Klinger et al. 1968; Müller et al. 1971).

Anders verläuft das Abklingen auf mRNA-Ebene. Aus den eigenen Befunden an frisch präparierten Leberschnitten geht hervor, dass schon 48 Stunden nach Ende der Vorbehandlung ein Abfall der CYP2B1-mRNA-Konzentration in den Bereich unbehandelter Tiere stattgefunden hatte. Auch hier spiegeln sich die In-vivo-Verhältnisse offenbar ungestört in den Leberschnitten wider. Wie bereits oben angeführt, stieg die spezifische zytosolische mRNA-Konzentration mit wiederholter im Vergleich zu einmaliger PB-Injektion nicht weiter an, sondern zeigte eher eine Tendenz zu niedrigeren Gleichgewichtsspiegeln (Adesnik et al. 1981). Der Abfall, der nur nach einmaliger Vorbehandlung gezeigt wurde, betrug vom Maximalspiegel aus (20 Stunden nach der PB-Injektion) innerhalb weiterer 20 Stunden mehr als 60%. Somit stimmen die eigenen Befunde hinsichtlich der CYP2B1-mRNA in Leberschnitten mit den in der Literatur beschriebenen In-vivo-Verhältnissen überein. Hier gibt es, im Unterschied zum Abklingen der CYP2B-abhängigen Monooxygenasereaktionen in vivo, Parallelen zu anderen Induktionstypen. Auch die BNF-induzierte CYP1A1-mRNA und die Dexamethason-induzierte CYP3A1-mRNA waren 48 Stunden nach Ende der Vorbehandlung bereits auf Werte von unbehandelten Tieren abgefallen (Glöckner et al. 2001; Lieder et al. 2007).

Es lässt sich also festhalten, dass durch die übliche Vorbehandlung von Ratten mit PB verschiedene CYP2B-Ausgangslagen in Leberschnitten auf Enzymaktivitätsebene erzeugt werden konnten, je nach Latenz bis zur Entnahme des Spendergewebes. Auf mRNA-Ebene war nur nach der Mindestlatenz von 24 Stunden, nicht aber später, die CYP2B1-Expression in den Leberschnitten zum Zeitpunkt der Präparation erhöht. Kürzere Zeitabstände nach PB in vivo bis zur Gewebeentnahme, in denen sich möglicherweise abgestufte Veränderungen der CYP2B1-mRNA-Expression schon herausgebildet haben könnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

6.2 Abklingen der in vivo ausgelösten CYP2B-Induktion in den Leberschnitten während der Inkubation

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Leberschnitte bis zu 24 Stunden inkubiert. In dieser Zeit war mit Veränderungen der Ausgangseigenschaften des Spendergewebes zu rechnen. In vorausgegangenen Untersuchungen unter gleichen Bedingungen war bereits gezeigt worden, dass die PROD-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter Ratten innerhalb von 24 Stunden im Mittel um ca. 50% abfällt (Müller et al. 2000). Eine ähnliche PROD-Verminderung war auch in den eigenen Versuchen bei allen Gruppen unabhängig vom Ausgangsniveau bzw. von der Latenz der Gewebeentnahme nach PB in vivo zu verzeichnen (s. **Abbildung 5.1**, **Abbildung 5.3**, **Abbildung 5.5**, **Abbildung 5.7**). Es ist anzunehmen, dass der mehr oder weniger starke Abfall verschiedener CYP-Aktivitäten in Leberschnitten in vitro (s. Gebhardt et al. 2003) zumindest teilweise durch den Untergang oder die hypoxische Schädigung von Leberzellen bedingt ist, wodurch die Regulation der betreffenden Enzyme wie Neosynthese, Transport, Membranbindung und Abbau modifiziert worden sein könnte. Wie licht- und elektronenmikroskopisch gezeigt wurde, kann eine solche Zellschädigung ganz unterschiedliche Ausmaße annehmen, je nach eng begrenzten lokalen Bedingungen innerhalb der Leberschnitte (Lupp et al. 2001; Neupert et al. 2003). Demzufolge ist der Aktivitätsabfall von Versuch zu Versuch nicht immer gleich stark. Unter optimalen Bedingungen ist eine vollständige Aufrechterhaltung sogar bis 48 Stunden möglich (Müller et al. 1998). Von Bedeutung mögen auch Veränderungen in der Genexpression für verschiedene Transkriptionsfaktoren und andere Mediatoren sein, die in Leberschnitten im Vergleich zu In-vivo-Verhältnissen von Boess et al. (2003) nachgewiesen wurden und sich

dann möglicherweise auf die Ausprägung differenzierter Zellfunktionen in vitro auswirken. Für solche allgemeingültigen Ursachen des CYP-Aktivitätsabfalls über 24 Stunden in vitro spricht die Beobachtung, dass in Leberschnitten im Mittel bei verschiedenen Modellreaktionen, die durch unterschiedliche CYP-Formen katalysiert werden, ähnliche Verlustraten auftreten (Gebhardt et al. 2003), obwohl die Halbwertszeiten der entsprechenden Proteine zumindest in vivo differieren (Watkins et al. 1986). Auch der Vergleich mit isolierten Hepatozyten lässt einen solchen Zusammenhang vermuten, da dort der Verlust von CYP-Aktivitäten viel stärker und schneller erfolgt, was im Zuge der Entdifferenzierung parallel mit einer viel deutlicheren Veränderung der gesamten Genexpression stattfindet, als in Präzisionsleberschnitten (Boess et al. 2003; Paine & Andreacos 2004; Kienhuis et al. 2007).

Letztlich blieb in den eigenen Untersuchungen der PROD-Aktivitätsunterschied zwischen Leberschnitten unbehandelter und PB-behandelter Ratten auch über 24 Stunden in vitro weitgehend bestehen, wenn auch auf niedrigerem Niveau als kurz nach der Schnittpräparation (**Abbildung 5.9**). Dies wurde auch in anderen Untersuchungen des hiesigen Instituts gefunden (Stahmann 2003). Ähnliche Verhältnisse waren für die CYP3A-vermittelte Testosteronhydroxylierung gezeigt worden, die in Leberschnitten unbehandelter und Dexamethason-behandelter Ratten verglichen wurde (Lieder 2007), wobei dort jedoch die Unterschiede nicht über mehrere Tage bestehen blieben. Es lässt sich demnach konstatieren, dass eine CYP-Induktion von Spendergewebe in vivo zunächst in Leberschnitten erhalten bleibt und je nach absolutem Ausmaß der Aktivitätssteigerung auch noch während der Inkubation der Schnitte fortbestehen kann. Bei sehr starker Aktivitätserhöhung, wie im Falle der PROD nach PB in vivo, bleibt der Induktionseffekt in den Leberschnitten länger nachweisbar. Bei moderater Aktivitätserhöhung, wie im Falle der 2 β -Testosteronhydroxylierung nach Dexamethason in vivo, führt der übliche Abfall während der Schnittinkubation in vitro schneller in Bereiche von Schnitten unbehandelter Tiere.

Dagegen reagieren die Konzentrationen aller jeweiligen CYP-mRNAs deutlich schneller auf Veränderungen (Zufuhr oder Ausbleiben eines Induktors) als die Modellreaktionen zum Enzymaktivitätsnachweis. Dies war zu erwarten, weil die mRNA-Expression der Proteinsynthese vorausgeht. So sind nach Rückgang der mRNA-Konzentration die bereits synthetisierten Enzyme noch weiter aktiv. Außerdem erfolgt die mRNA-Bestimmung mittels RT-PCR sehr spezifisch für ein einziges CYP, während Monooxygenasereaktionen oft durch mehrere CYP katalysiert werden. Dies ist auch bei der PROD der Fall,

insbesondere in nichtinduziertem Lebergewebe (Burke et al. 1994). Ein Aktivitätsrückgang nach Induktion könnte daher durch die Beteiligung nichtinduzierter CYP-Formen maskiert werden.

Obwohl in den eigenen Versuchen die In-vivo-Induktion auf mRNA-Ebene zunächst (24 Stunden nach Ende der Vorbehandlung) deutlich ausgeprägt war, fiel die erhöhte CYP2B1-mRNA während der Inkubation der Leberschnitte schnell ab. Dieser Abfall in vitro war ebenso schnell wie in vivo (bis 48 Stunden nach Ende der Vorbehandlung), so dass innerhalb von 24 sowohl in vivo als auch bei der Inkubation in vitro Basalwerte wie in Schnitten unbehandelter Tiere erreicht wurden (vgl. **Abbildung 5.11**). Die Stabilität von CYP2B1-mRNA bei Leberschnitten unbehandelter Ratten über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden unter gleichen Bedingungen war bereits in früheren Untersuchungen gezeigt worden (Müller et al. 2000). Dies konnte in den Stichproben der vorliegenden Arbeit nun bestätigt werden und trifft auch für die schon in vivo wieder abgefallenen Konzentrationen in den Schnitten 48 Stunden nach Ende der PB-Vorbehandlung zu. Ein solcher Verlauf wurde für andere Induktionstypen gleichermaßen beschrieben (Glöckner et al. 2001; Lieder et al. 2007), sodass offenbar generell ein schneller Abfall induzierter CYP-mRNA-Formen in vitro die Regel ist. Damit konnte gezeigt werden, dass sich Leberschnitte aus PB-induziertem Spendergewebe hinsichtlich CYP2B1-mRNA-Expression nach einer 24-stündigen Inkubation nicht (mehr) von solchen unbehandelter Gewebedonatoren unterscheiden.

6.3 CYP2B-Induzierbarkeit in vitro in Leberschnitten PB-behandelter Ratten

Das Hauptanliegen dieser Arbeit bestand darin, die In-vitro-Induzierbarkeit in Leberschnitten aus vorinduziertem Spendergewebe zu untersuchen. Damit sollte ein Beitrag zur Verwendbarkeit von Humanleber mit unbekanntem Ausgangszustand geleistet werden. Da die Induzierbarkeit von der Ausgangslage des Spendergewebes beeinflusst werden kann (Bjornsson et al. 2003), war vor allem hinsichtlich der anhaltend erhöhten PROD in den Leberschnitten nach PB-Behandlung in vivo eine Veränderung gegenüber Leberschnitten unbehandelter Tiere zu erwarten, nicht aber auf CYP2B1-mRNA-Ebene mit schnellem Rückgang des In-vivo-Induktionseffekts. Dies wurde in den eigenen Ergebnissen bestätigt.

Die basale und induzierte CYP2B-Expression von Rattenleberschnitten unterliegt sowohl auf Enzymaktivitäts- (PROD) als auch auf mRNA-Ebene relativ großen Schwankungen (Müller et al. 2000; Stahmann 2003). Deshalb wurde parallel zu den Versuchen mit Gewebe vorbehandelter Ratten zunächst die prinzipielle In-vitro-Induzierbarkeit von Leberschnitten unbehandelter Ratten durch Exposition gegenüber 100 μ M PB über 24 Stunden reproduziert. Die eingesetzte Induktorkonzentration war von verschiedenen Arbeitsgruppen an unterschiedlichen In-vitro-Modellen als optimal beschrieben worden (Sidhu & Omiecinsky 1995; Madan et al. 1999) und hatte sich auch an Rattenleberschnitten zur CYP2B-Induktion binnen 24 Stunden bewährt (Müller et al. 2000; Stahmann 2003; Glöckner et al. 2007). Der in den eigenen Versuchen gefundene mittlere Induktionsfaktor von 8 für die CYP2B-abhängige Aktivitätssteigerung lag in der gleichen Größenordnung wie in anderen Untersuchungen mit Rattenleberschnitten (Lake et al. 1993, 1996; Müller et al. 2000; Stahmann 2003; Gebhardt et al. 2003). Lediglich in einer einzigen Arbeit wurden 5-10-fach höhere Faktoren erreicht, allerdings über 96 Stunden PB-Exposition der Leberschnitte (Catania et al. 2007), während Gokhale et al. (1997) keine Induktion CYP2B-abhängiger Monooxygenasereaktionen durch 2 mM PB über 24 oder 96 Stunden erreichten. Auch auf mRNA-Ebene stimmte der eigene Induktionsfaktor von 19 für die CYP2B1-mRNA im Prinzip mit den meisten veröffentlichten Angaben anderer Autoren überein (Müller et al. 2000; Stahmann 2003; Pan et al. 2002; Meredith et al. 2003). Einen deutlich höheren Faktor von 600 beschrieben Martignoni et al. (2004), dieser wurde jedoch mit einer 10-fach höheren PB-Konzentration bei gleichzeitigem DMSO-Zusatz zum Inkubationsmedium erzielt, wobei der möglicherweise sehr niedrige zugehörige Kontrollwert nichtexponierter Schnitte aufgrund der Methodik (Taqman-Technik) nicht ersichtlich war.

Im Vergleich zur Induzierbarkeit von Leberschnitten unbehandelter Ratten gab es vor allem bei der PROD Veränderungen durch die PB-Vorbehandlung der Spendertiere. Je höher die mittlere Ausgangsaktivität in diesen Leberschnitten nach 24 Stunden Inkubation noch war, nämlich am höchsten 24 Stunden nach der letzten PB-Vorbehandlung, umso geringere Induktionsfaktoren konnten durch PB in vitro erreicht werden. Dies ist offenbar nicht an bestimmte CYP-Induktionstypen gebunden, sondern kann als allgemeingültige Aussage betrachtet werden, wie sie bereits von anderen Autoren getroffen wurde (McCune et al. 2000; Lindley et al. 2002; Björnsson et al. 2003). In diesem Zusammenhang erscheint die alleinige Betrachtung von Induktionsfaktoren weniger aussagekräftig als die Beurteilung absoluter Enzymaktivitäten ohne und mit Induktorexposition. Letzteres

entspricht den Empfehlungen von Bjornsson et al. (2003) aus Sicht der Pharmaindustrie. So kann vermieden werden, dass eine Aktivitätssteigerung auf sehr niedrigem Niveau eine starke Induktion vortäuscht oder eine scheinbar geringe Induktion auf sehr hohem Niveau übersehen wird. Im Falle der eigenen Befunde waren die absoluten PROD-Aktivitäten bis zu drei Tagen nach Ende der PB-Injektionen der Spendertiere auch ohne PB-Exposition *in vitro* sehr hoch, sogar deutlich höher, als es *in vitro* in Leberschnitten unbehandelter Tiere mit PB erreicht wurde. Im Kontext mit der gleichzeitigen Bestimmung der mRNA-Induktion stellen jedoch die relativ geringen Induktionsfaktoren bei der PROD kein Ausschlusskriterium für eine stattgefundene Induktionswirkung von Fremdsubstanzen dar. Die CYP2B1-mRNA war innerhalb von 24 Stunden immerhin zwischen 11- und 19-fach durch PB gesteigert worden, unabhängig davon, ob die Leberschnitte *in vivo* präinduziert waren oder nicht. Sogar innerhalb von 6 Stunden hatte sich eine Induktion schon angedeutet, was den Erfahrungen mit Leberschnitten unbehandelter Ratten entspricht (Müller et al. 2000).

Es gibt kaum systematische Untersuchungen zur CYP-Induktion *in vitro* in vorinduziertem Spendergewebe. Unter den gleichen Bedingungen wie bei der vorliegenden Arbeit war die PROD ebenfalls nicht in Leberschnitten PB-behandelter Tiere wiederinduzierbar, wohingegen die CYP2B1-mRNA-Konzentration sicher durch PB-Exposition *in vitro* erhöht wurde (Stahmann 2003). Die mRNA-Induktion der eigenen Stichproben lag in der gleichen Größenordnung wie bei Stahmann (2003), die allerdings relativ große interindividuelle Unterschiede feststellte. Außerdem konnte Stahmann (2003) zeigen, dass eine verlängerte Vorinkubation der präinduzierten Leberschnitte von bis zu 22 Stunden vor der PB-Zugabe nicht zur Verbesserung der PROD-Induktion führt, da bei dieser verlängerten Gesamtinkubation der *In-vivo*-Effekt nicht schnell genug verschwindet, mitunter aber ein Nachlassen der Schnittqualität entstehen kann. Die abgeleitete Empfehlung, bei vorbestehender hoher CYP-Aktivität der Leberschnitte und ausbleibender Induktionswirkung einer Prüfsubstanz zusätzlich die Induktion auf mRNA-Ebene zu bestimmen, kann auch für die vorliegenden eigenen Befunde getroffen werden. Damit wird auch der Auffassung der Pharmaindustrie Rechnung getragen, routinemäßig die Bestimmung der Enzymaktivitäten als Methode der Wahl zur Auffindung einer *In-vitro*-Induktion einzusetzen und nur bei fehlender Bestimmungsmethode oder unschlüssigen Resultaten eine mRNA-Bestimmung durchzuführen (Bjornsson et al. 2003). Mit dem gleichen Versuchsansatz wie in der vorliegenden Arbeit war für andere Induktionstypen eine *In-vitro*-Induktion von CYP1A1 bzw. CYP3A1 mit den bekannten Modellinduktoren

BNF bzw. Dexamethason in präinduzierten Leberschnitten problemlos durch die Bestimmung der entsprechenden Modellreaktionen möglich, da hierbei die In-vivo-Induktion im Spendergewebe schnell wieder abklang (Glöckner et al. 2001; Lieder 2007). Wenn die Induktoreigenschaften einer Prüfsubstanz noch unbekannt sind, ist allerdings das Mitführen einer Positivkontrolle sinnvoll (Bjornsson et al. 2003).

6.4 Ausblick auf die Nutzung von Präzisionsleberschnitten

Jedes Jahr werden unzählige Substanzen von der chemischen Industrie synthetisiert. Die Kosten für Tierversuche, die notwendig sind, um nur eine dieser Substanzen auf ihre Sicherheit zu testen, sind immens. Dies führt zu einem Bedarf an der Entwicklung günstigerer In-vitro-Systeme (Lerche-Langrand & Toutain 2000). Präzisionsleberschnitte bieten hier eine Reihe von Vorteilen. So können manipulierte Bedingungen und Kontrollbedingungen am gleichen Individuum getestet werden, wodurch es zu geringerer Variabilität kommt. Für Dosis-Wirkungs-Beziehungen sind geringere Mengen der Testsubstanz erforderlich und durch Reduktion der Anzahl von Versuchstieren erreicht man gleichzeitig eine Kostensenkung (Lerche-Langrand & Toutain 2000). Präparation, Inkubation und Umgang mit den Schnitten sind einfach und nicht teuer. Auch die Komplexität der Leberstruktur bleibt erhalten. Im Gegensatz zu anderen In-vitro-Modellen können daher auch morphologische Veränderungen nach Xenobiotika-Exposition untersucht werden (Gebhardt et al. 2003). Des Weiteren bietet die Kryokonservierung (mit ausreichend suffizienter Gewebefunktion nach dem Auftauen) die Möglichkeit der Nutzung humanen Gewebes (Glöckner et al. 1999). Trotzdem wird vermutlich kein In-vitro-System je in der Lage sein, die komplexen Zellinteraktionen eines gesamten Organismus exakt wiederzugeben. Auch die Responsibilität auf Substanzen kann von In-vivo-Daten abweichen, sodass man auf In-vivo-Versuche letztlich nie ganz verzichten können wird (Lerche-Langrand & Toutain 2000; Bjornsson et al. 2003). Dennoch finden Präzisionsleberschnitte aus oben genannten Gründen bereits eine weite Akzeptanz als In-vitro-Modell für pharmakotoxikologische Untersuchungen. Durch den Erhalt von Transport-, Signal- und metabolischen Wegen eignen sie sich bei der Untersuchung neuer chemischer Substanzen zur Bestimmung und Vorhersage von (an der Metabolisierung beteiligten) Enzymen, Clearance-Raten, Medikamenteninteraktionen und potentiellen Transportwegen in vivo (Ekins 1996), auch wenn aufgrund der zeitlich begrenzten Vitalität

der Leberschnitte (ca. 72 Stunden Inkubation) derzeit keine längerfristigen Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von Noxen möglich sind. Hier könnten noch Möglichkeiten der Optimierung von Versuchsbedingungen (z.B. Inkubationsmedium) ausgeschöpft werden. Auch die Ergebnisse mit kryokonservierten Schnitten bieten Anlass zu weiterer Optimierung (Gebhardt et al. 2003). Des Weiteren bedarf es zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Autoren einer Standardisierung von Versuchsparametern wie Schnittdicke und -durchmesser oder Inkubationsmedium (Parrish et al. 1995; Bjornsson et al. 2003).

Die vorgelegte Arbeit ist als Beitrag solcher Optimierungs- und Standardisierungsbestrebungen einzuordnen. Die Ergebnisse der eigenen und vorangegangener Untersuchungen (Glöckner et al. 2001, Lieder 2007) belegen die Nutzbarkeit von Leberschnitten mit erhöhtem CYP-Expressionszustand (durch Induktion *in vivo*) für nachfolgende Induktionsversuche *in vitro*. Insbesondere die Problematik hinsichtlich der PROD und die Vorteile der RT-PCR als Nachweismethode zur CYP2B-Induktion liefern wichtige Hinweise für potentielle Untersuchungen an humanem Gewebe.

7 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen lassen sich die folgenden Aussagen ableiten:

1. Eine CYP2B-Vorinduktion von Lebergewebe in vivo ist je nach Latenz zwischen Induktorexposition und Entnahme des Spendergewebes in Leberschnitten sichtbar. Trotzdem sind auch vorinduzierte Leberschnitte zur Untersuchung einer CYP2B-Induktion in vitro geeignet.
2. Der Nachweis der Induktion kann prinzipiell auf Monooxygenaseebene und auf mRNA-Ebene erfolgen. Mit einer starken interindividuellen Variabilität einer CYP2B-Induktion ist auf beiden Ebenen zu rechnen.
3. Die PROD als CYP2B-abhängige Monooxygenasereaktion eignet sich nur dann zum Induktionsnachweis an Leberschnitten, wenn Spendergewebe ohne CYP2B-Vorinduktion verwendet wurde oder wenn eine zuvor in vivo stattgehabte CYP2B-Induktion des Spendergewebes bereits abgeklungen ist. Letzteres ist vom Zeitpunkt der Gewebeentnahme nach Absetzen eines potentiellen CYP2B-Induktors abhängig.
4. Mit der Bestimmung der CYP2B1-mRNA-Konzentration lässt sich eine In-vitro-Induktion durch PB in Leberschnitten sowohl aus nichtinduziertem als auch aus CYP2B-vorinduziertem Spendergewebe nachweisen. Der Zeitpunkt der Gewebeentnahme hat darauf keinen Einfluss.
5. Im Hinblick auf die Nutzung von Humanleberschnitten ohne Kenntnis einer Vorinduktion eignet sich die Bestimmung der CYP2B-mRNA-Konzentration besser zur Untersuchung der Induktion durch Induktoren des PB-Typs als eine Bestimmung der PROD.

8 Literaturverzeichnis

- Adesnik M, Bar-Nun S, Maschio F, Zunich M, Lippman A, Bard E. 1981. Mechanism of induction of cytochrome P-450 by phenobarbital. *J Biol Chem* 256: 10346-10353.
- Agrawal AK, Shapiro BH. 2003. Constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 isoforms in senescent male and female rats and response to low-dose phenobarbital. *Drug Metab Dispos* 31:612-619.
- Alekseeva LI. 2004. Ecdysone 20-monooxygenase activity of cytochrome P450 in plants and cell culture of *Ajuga reptans* L. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 40:159-164.
- Baldwin SJ, Bramhall JL, Ashby CA, Yue L, Murdock PR, Hood SR, Ayrton AD, Clarke SE. 2006. Cytochrome P450 gene induction in rats *ex vivo* assessed by quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (TaqMan®). *Drug Metab Dispos* 34:1063-1069.
- Binda D, Lasserre-Bigot A, Bonet M, Thomassin MP, Come C, Guinchard R, Jacqueson BA, Richert L. 2003. Time course of cytochromes P450 decline during rat hepatocyte isolation and culture. *Toxicol In Vitro* 17:59-67.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach SR, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA. 2003. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies. *J Clin Pharmacol* 43:443-469.
- Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Müller D, Albertini S, Suter L. 2003. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci.* 73:386-402.

- Brouwer KLR, Kostenbauder HB, McNamara PJ, Blouin RA. 1984. Phenobarbital in the genetically obese Zucker rat. I. Pharmacokinetics after acute and chronic administration. *J Pharmacol Exp Ther* 231:649-653.
- Bühler R, Lindros KO, Nordling A, Johansson I, Ingelmann-Sundberg M. 1992. Zonation of cytochrome P450 isoenzyme expression and induction in rat liver. *Eur J Biochem* 204:407-412.
- Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 48:923-936.
- Catania JR, McGarrigle BP, Rittenhouse-Olson K, Olson JR. 2007. Induction of CYP2B and CYP2E1 in precision-cut rat liver slices cultured in defined medium. *Toxicol In Vitro* 21:109-115.
- Clayton DF, Harrelson AL, Darnell LE Jr. 1985. Dependence of liver-specific transcription on tissue organization. *Mol Cell Biol*. 5:2623-2632.
- Constan AA, Sprankle CS, Peters JM, Kedderis GL, Everitt JI, Wong BA, Gonzalez FL, Butterworth BE. 1999. Metabolism of chloroform by cytochrome P450 2E1 is required for induction of toxicity in the liver, kidney, and nose of male mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 160:120-127.
- Coon MJ, Vaz AD, Bestervelt LL. 1996. Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes. *FASEB J* 10:428-434.
- Dogterom P. 1993. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos* 21:699-704.
- Drobner C, Glöckner R, Müller, D. 2000. Optimal oxygen tension conditions for viability and functioning of precision-cut liver slices. *Exp Toxicol Pathol* 52:335-338.

- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR, Lake BG. 2003. Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos* 31:282-288.
- Ekins S. 1996. Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 28:591-623.
- Forrester LM, Henderson CJ, Glancey MJ, Back DJ, Park BK, Ball SE, Kitteringham NR, McLaren AW, Miles JS, Skett P, Wolf CR. 1992. Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem J* 281:359-368.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K. 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Achte Aufl. München, Jena: Urban und Fischer.
- Fujisaki H, Mise M, Ishii Y, Yamada H, Oguri K. 1994. Strychnine and brucine as the potent inducers of drug metabolizing enzymes in rat liver: different profiles from phenobarbital on the induction of cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1024-1031.
- Fukuda H, Fujii T, Daimon H, Iwata M, Ogawa T, Tanase S, Morino Y. 1993. Purification and characterization of cytochrome P450 from an isobutene-forming microorganism, *Rhodotorula minuta*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1599-1601.
- Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D, Glöckner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Reder Hilz B, Bader A, Langsch A, Koese T, Burger HJ, Maas J, Oesch F. 2003. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in Basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev* 35:145-213.
- Gebhardt R. 1992. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 53:275-354.

- Gibson GG, Plant NJ, Swales KE, Ayrton A, El-Sankary W. 2002. Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P450A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* 32:165-206.
- Glöckner R, Steinmetzer P, Drobner C, Müller D. 1998. Application of cryopreserved precision-cut liver slices in pharmacotoxicology-principles, literature data and own investigations with special reference to CYP1A1-mRNA induction. *Exp Toxicol Pathol* 50:440-449.
- Glöckner R, Steinmetzer P, Drobner C, Müller D. 1999. Use of fresh and cryopreserved human liver slices in toxicology with special reference to in vitro induction of cytochrome P450. *Toxicol In Vitro* 13:531-535.
- Glöckner R, Sünkel E, Steinmetzer P, Müller D. 2001. Influence of different CYP1A1-mRNA expression states after induction in vivo on subsequent inducibility in vitro in rat liver slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:R 164.
- Glöckner R, Rohländer S, Müller D. 2007. Is in-vitro induction of CYP2B in rat liver slices (RLS) by phenobarbital (PB) influenced by CYP3A inducing dexamethasone (DEX)? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375:71-71.
- Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, Yager JD. 1997. Cytochrome P450 isoenzyme activities in cultured rat and mouse liver slices. *Xenobiotica* 27:341-356.
- Handschin C, Meyer UA. 2003. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 55:649-673.
- Honkakoski P, Negishi M. 1998. Regulatory DNA elements of phenobarbital-responsive cytochrome P450 CYP2B genes. *J Biochem Mol Toxicol* 12:3-9.
- Ioannides C, Parke DV. 1975. Mechanism of induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by a series of barbiturates. *J Pharm Pharmacol* 27:739-46.

- Jessen BA, Mullins JS, de Peyster A, Stevens GJ. 2003. Assessment of hepatocytes and liver slices as in vitro test systems to predict in vivo gene expression. *Toxicol Sci* 75:208-222.
- Kienhuis AS, Wortelboer HM, Maas WJ, van Herwijne M, Kleinjans JCS, van Delft JHM, Stierum RH. 2007. A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicol In Vitro* 21:892-901.
- Klingenberg M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 75:376-386.
- Klinger W, Kusch T, Neugebauer A, Splinter FK, Ankermann H. 1968. Untersuchungen zum Mechanismus der Enzyminduktion. XIV. Der Einfluss des Lebensalters auf die Aktivität und Induzierbarkeit der Phenazon-Hydroxylase, Aminophenazon-N-Demethylase, Kodein-O-Demethylase und Nitro-Reduktase der Rattenleber. *Acta Biol Med Ger* 21:257-269.
- Klinger W, Müller D. 1974. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. *Z Versuchstierkd* 16:149-153.
- Krebs HA. 1933. Hoppe-Seyl. *Z.* 217:191.
- Krumdieck CL, Dos Santos JE, Ho, KJ. 1980. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem* 104:118-123.
- Lake BG, Beamand JA, Japenga AC, Renwick A, Davies S, Price RJ. 1993. Induction of cytochrome P450-dependent enzyme activities in cultured rat liver slices. *Chem Toxic* 31:377-386.

- Lake BG, Charzat C, Tredger JM, Renwick AB, Beamand JA, Price RJ. 1996. Induction of cytochrome P450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica* 26:297-306.
- Lerche-Langrand C, Toutain HJ. 2000. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology* 153:221-253.
- Lieder A. 2007. Veränderung der CYP3A-Expression und -Aktivität an Rattenleberschnitten nach Induktion in vivo und in vitro [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, Hawke RL, Wang H, Gilbert D, Jolley S, Yan B, LeCluyse EL. 2002. The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 30:814-821.
- Lupp A, Danz M, Müller D. 2001. Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology* 161:53-66.
- Madan A, Dehaan R, Mudra D, Carroll K, Lecluyse E, Parkinson A. 1999. Effect of cryopreservation on cytochrome P450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 27:327-335.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (Hrsg.). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, Mahnke A, Saturno G, Monshouwer M. 2004. An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact* 151: 1-11.
- McCune JS, Hawke RL, LeCluyse EL, Gillenwater HH, Hamilton G, Ritchie J, Lindley C. 2000. In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clin Pharm Ther* 68:356-366.

- Mentzel T, Patzer L. 1990. Der Einfluss von Prostaglandin F 2a auf die Induktion des hepatischen Cytochrom-P450-Systems durch Phenobarbital und Betanaphtoflavon: Abhängigkeit der O-Dealkylaseaktivität vom Lebensalter (PEROD), der Induktordosis (EROD) und von dem Modulator Prostaglandin F 2a [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RJ, Lake BG. 2003. Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica* 33:511-527.
- Meyer UA. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 24:449-459.
- Müller D, Reichenbach F, Klinger W. 1971. Die Aktivität der Nitroreduktase und deren Induzierbarkeit durch Barbitol in der Leber von Ratten verschiedenen Alters. *Acta Biol Med Ger* 27:605-609.
- Müller, D. 1990. Influence of xenobiotics on drug metabolism and its sensitive detection. *Exp Pathol* 39:187-94.
- Müller D, Glöckner R, Rost M, Steinmetzer, P. 1998. Monooxygenation, cytochrome P450-mRNA expression and other functions in precision-cut rat liver slices. *Exp. Toxic Pathol* 50:507-513.
- Müller D, Steinmetzer P, Pissowotzki K, Glöckner R. 2000. Induction of cytochrome P450 2B1-mRNA and pentoxyresorufin O-depentylation after exposure of precision-cut rat liver slices to phenobarbital. *Toxicology* 144:93-97.
- Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 10:397-398.

- Neupert D, Glöckner R, Neupert G, Müller D. 2003. Ultrastructural changes in hepatocytes of precision-cut rat liver slices after incubation for 24 and 48 hours. *Exp Toxicol Pathol* 54:481-488.
- Neupert D. 2006. Präzisionsgeschnittene Rattenleberscheiben: eine biochemische, funktionelle und morphologische Studie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Omiecinski CJ, Walz FG, Vlasuk GP. 1985. Phenobarbital induction of rat liver cytochromes P-450b and P-450e. *J Biol Chem* 260: 3247-3250.
- Paine AJ, Andreacos E. 2004. Activation of signalling pathways during hepatocyte isolation: relevance to toxicology in vitro. *Toxicol In Vitro* 18:187-193.
- Pan J, Xiang Q, Renwick AB, Price RJ, Ball SE, Kao J, Scatina JA, Lake BG. 2002. Use of quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the induction of CYP1A, CYP2B and CYP4A forms in precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*. 32:739-747.
- Parkinson A. 1996. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol Pathol* 24(1):45-57.
- Parrish AR, Gandolfi J, Brendel K. 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* 57:1887-1901.
- Phillips IR, Shephard EA, Bayney RM, Pike SF, Rabin BR, Heath R, Carter N. 1983. Induction and repression of the major phenobarbital-induced cytochrome P-450 measured by radioimmunoassay. *Biochem J*. 212:55–64.
- Pohl RJ, Fouts, JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxy-resorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem* 107:150–155.

- Powis G, Melder DC, Wilke TJ. 1989. Human and dog, but not rat, isolated hepatocytes have decreased foreign compound-metabolizing activity compared to liver slices. *Drug Metab Dispos* 17:526-531.
- Pustyl'nyak VO, Gulyaeva LF, Lyakhovich VV. 2005. CAR expression and inducibility of CYP2B genes in liver of rats treated with PB-like inducers. *Toxikology* 216:147-153.
- Renwick AB, Watts PS, Edwards RJ, Barton PT, Guyonnet I, Price RJ, Tredger M, Pelkonen O, Boobis AR, Lake BG. 2000. Differential maintenance of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos* 28:1202-1209.
- Saad B, Scholl FA, Thomas H, Schawalder H, Streit V, Waechter F, Maier P. 1993. Crude liver membrane fractions and extracellular matrix components as substrata regulate differentially the preservation and inducibility of cytochrome P-450 isoenzymes in cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem* 213: 805-814.
- Sadano H, Omura T. 1983. Turnover of two drug-inducible forms of microsomal cytochrome P-450 in rat liver. *J Biochem.* 93:1375-1383.
- Schröder M. 1999. Isolierung von RNA. In H. In Gassen HG, Schimpf G (Hrsg.). *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Schuetz EG, Schmid W, Schutz G, Brimer C, Yasuda K, Kamataki T, Bornheim L, Myles K, Cole TJ. 2000. The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P450 reductase in mouse liver. *Drug Metab Disp* 28:268-278.
- Shinohara T, Taura K, Imamura T, Yamada H, Oguri K. 1997. Induction of rat hepatic cytochrome P450 2B subfamily by azidophenobarbital, as a possible photoaffinity probe for the putative phenobarbital receptor. *Drug Metab Disp* 25:1442-1446.

- Sidhu JS, Omiecinski CJ. 1995. cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 270:12762-12773.
- Smith PF, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Putnam CW, Zukoski CF 3rd, Davis WM, Brendel K. 1985. Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. *Life Sci* 36:1367-1375.
- Stahmann N. 2003. In-vitro-Induktion der 7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung und von Cytochrom-P450-2B1-mRNA in Präzisionsleberschnitten Phenobarbital-vor-behandelter Ratten [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät.
- Testa B, Krämer SD. 2006. The biochemistry of drug metabolism - an introduction: part 1. principles and overview. *Chem Biodivers* 3:1053-1101.
- Ueda A, Hamadeh HK, Webb HK, Yamamoto Y, Sueyoshi T, Afshari CA, Lehmann JM, Negishi M. 2001. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol Pharmacol* 61:1-6.
- Warburg O. 1923. Versuche an überlebendem Karzinomgewebe. *Biochem Z* 142:317-333.
- Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P, Guzelian PS. 1986. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid- responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture. *J Biol Chem* 261:6264-6271.
- Waxman DJ, Azaroff L. 1992. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* 281:577-592.
- Waxman DJ. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 369:11-23.

- Worboys PD, Carlile DJ. 2001. Implications and consequences of enzyme induction on preclinical and clinical drug development. *Xenobiotica* 31:539-556.
- Yamada, Hideyuki, Ishii, Yuji, Yamamoto, Midori, Oguri, Kazuta. 2006. Induction of the hepatic cytochrome P450 2B subfamily by xenobiotics: research history, evolutionary aspect, relation to tumorigenesis, and mechanism. *Curr Drug Metab* 7:397-409.
- Yamazaki H, Inui Y, Wrighton SA, Guengerich FP, Shimada T. 1995. Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in *Escherichia coli* and by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 16:2167-2170.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Strukturformel von Phenobarbital	15
Abbildung 4.1: Krumdieck Tissue-Slicer: a) zusammengesetzt, b) Einzelelemente	26
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns	28
Abbildung 4.3: Gel-Elektrophorese einer kompetitiven RT-PCR	37
Abbildung 5.1	38
PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten unbehandelter Ratten nach einer 2- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro.	
Abbildung 5.2	39
CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten einer unbehandelten Ratte nach einer 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro.	
Abbildung 5.3	40
PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter Ratten nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro. Schnittpräparation 24h nach letzter PB-Gabe.	
Abbildung 5.4	41
CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten einer PB-behandelten Ratte nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro. Schnittpräparation 24h nach letzter PB-Gabe.	
Abbildung 5.5	42
PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter Ratten nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro. Schnittpräparation 48h nach letzter PB-Gabe.	

Abbildung 5.6 _____ 43

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten einer PB-behandelten Ratte nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro. Schnittpräparation 48h nach letzter PB-Gabe.

Abbildung 5.7 _____ 44

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter Ratten nach einer 2-, 6- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro. Schnittpräparation 72h nach letzter PB-Gabe.

Abbildung 5.8 _____ 46

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten PB-behandelter Ratten nach einer 2- oder 24-stündigen Inkubation ohne oder mit PB-Exposition in vitro. Schnittpräparation 4 - 6 Tage nach letzter PB-Gabe.

Abbildung 5.9 _____ 47

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter Ratten nach 2- und 24-stündiger Inkubation ohne PB in vitro. Unterschiedliche Latenz zur letzten PB-Gabe.

Abbildung 5.10 _____ 48

PROD-Aktivität in Homogenat von Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation ohne und mit PB in vitro. Unterschiedliche Latenz zur letzten PB-Gabe.

Abbildung 5.11 _____ 49

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter Ratten nach 0-, 2-, 6- und 24-stündiger Inkubation ohne PB in vitro. Unterschiedliche Latenz zur letzten PB-Gabe.

Abbildung 5.12 _____ 50

CYP2B1-mRNA-Expression in Präzisionsleberschnitten unbehandelter und PB-behandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation ohne und mit PB in vitro. Unterschiedliche Latenz zur letzten PB-Gabe.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Fünf CYP-Induktorklassen (nach Handschin & Meyer 2003)	12
Tabelle 4.1: Zusammensetzung von Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHP)	26
Tabelle 4.2: Zusätze zum Inkubationsmedium WME	27
Tabelle 4.3: RT-Mastermix (für eine Probe)	34
Tabelle 4.4: PCR-Mastermix (für eine Probe)	35

Danksagung

Ich danke

- Frau Dr. Glöckner für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung, konstruktive Diskussionen, kompetente Hilfe und Geduld,
- Herrn Prof. Müller für die anregenden Gespräche, inhaltlichen Hinweise zum Manuskript und das fortwährende Interesse,
- Herrn Dr. Steinmetzer für die Unterstützung bei der RT-PCR,
- Frau Meuche, Frau Guder und Frau Otum für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Versuche,
- meinem Vater für das Ermöglichen meines Studiums und damit dieser Arbeit,
- meinem Bruder für den geistlichen Beistand.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lerch, Christian
Geburtsdatum: 25.07.1976
Geburtsort: Hildesheim

Schulbildung:

07/1983 – 07/1987 Grundschole Eime
07/1987 – 06/1996 Gymnasium: Christophorus-Schule Elze
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1996 – 09/1997 Innere Medizin und Pathologie, Robert Koch
Krankenhaus Gehrden

Hochschulbildung:

10/1997 – 05/2004 Friedrich-Schiller-Universität Jena: Studiengang
Medizin

13.09.1999 Ärztliche Vorprüfung
29.08.2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10.09.2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05.05.2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruf:

01.09.2004 – 30.09.2004 Arzt im Praktikum - Klinik für Innere Medizin,
Friedrich-Schiller-Universität Jena

01.10.2004 – 31.08.2006 Assistenzarzt - Klinik für Innere Medizin, Friedrich-
Schiller-Universität Jena

seit 01.01.2007 Assistenzarzt - Klinik für Anästhesiologie und
Intensivtherapie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: (Frau PD Dr. R. Glöckner, Herr Prof. Dr. D. Müller),
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 03. Oktober 2007

Christian Lerch, Verfasser